

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOHAILA BOEHM IBRAHIM ARRAM

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Candida* spp. OBTIDOS
DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM CANDIDEMIA

CURITIBA

2008

SOHAILA BOEHM IBRAHIM ARRAM

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Candida* spp. OBTIDOS
DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM CANDIDEMIA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia – Área de Concentração: Microbiologia,
Setor de Ciências Biológicas e Setor da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vânia Aparecida
Vicente

CURITIBA

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS / BIBLIOTECA CENTRAL
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Arram, Sohaila Boehm Ibrahim

Epidemiologia molecular de isolados de *Cândida* spp. obtidos de pacientes pediátricos com candidemia / Sohaila Boehm Ibrahim Arram. – Curitiba, 2008. 58f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho

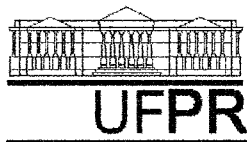
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente

Inclui referências

1. *Cândida*. 2. *Candidíase*. I. Telles Filho, Flávio de Queiroz, 1952-. II. Vicente, Vânia Aparecida. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV. Título.

CDD 616.969

Andrea Carolina Grohs CRB 9/1.384



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

**“EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP.
OBTIDOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM CANDIDEMIA”**

por

SOHAILA BOEHM IBRAHIM ARRAM

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, área de concentração em Microbiologia, pela Comissão formada
pelos professores:

Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho (Orientador e Presidente)

Profª. Drª. Patrícia do Rocio Dalzoto (Membro Titular)

Profª. Drª. Lygia Vitória Galli Terazawa (Membro Titular)

Profª. Drª Adriana de Oliveira Costa (Membro Suplente)

Curitiba, 3 de março de 2009

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela dedicação.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Micologia do HC-UFPR, pelo
fornecimento das amostras de *Candida* spp., e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Bonald Figueiredo, por permitir a realização dos experimentos nas
dependências do Instituto Pelé Pequeno Príncipe.

Aos colegas de trabalho, do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR e do
IPPP, por terem suportado minhas ausências e pelo apoio.

Aos meus amigos, pelo carinho e pela presença constante,
mesmo que virtual.

À minha família, por toda paciência, compreensão e apoio.

A Deus, por tudo isso e muito mais.

"A nossa recompensa está no esforço, não no resultado.
Um esforço total é uma vitória completa."

Gandhi

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS DE CANDIDEMIA E SUA IMPORTÂNCIA	13
2.1.1 <i>Candida albicans</i>	13
2.1.2 <i>Candida não-albicans</i>	14
2.2 PATOGÊNESE DA CANDIDEMIA	19
2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Candida</i>	22
2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Candida</i> spp.	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 A INSTITUIÇÃO	27
3.2 AMOSTRAS E PERÍODO DE ESTUDO	27
3.3 PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS	29
3.4 SUBCULTIVO DE LEVEDURAS	29
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	29
3.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR RAPD-PCR	30
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	31
3.8 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 PREVALÊNCIA DE <i>Candida albicans</i> E <i>Candida não-albicans</i> COMO AGENTES DE CANDIDEMIA	33
4.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA	36
5 PERSPECTIVAS	46
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
DOCUMENTOS CONSULTADOS	55
APÊNDICE	56
1 PREPARO DE MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cm	- centímetro
CTAB	- brometo de cetil-trimetilamônio (<i>cetyl trimethyl ammonium bromide</i>)
dATP	- desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	- desoxicitidina trifosfatada
dGTP	- desoxiguanosina trifosfatada
DNA	- ácido desoxirribonucléico
dNTP	- desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dTTP	- desoxitimidina trifosfatada
EDTA	- ácido etilenodiamino tetracético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EIA	- ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Immunoassay</i>)
EK	- <i>Electrophoresis Karyotyping</i>
<i>et al.</i>	- e outros (<i>et alli</i>)
f.	- folha
HC	- Hospital de Clínicas
HCl	- ácido clorídrico
HIV	- vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
H ₂ O	- água
ITS	- <i>Internal Transcribed Spacer</i>
kb	- kilobase
LLA	- leucemia linfóide aguda
LMA	- leucemia mielóide aguda
LMMC	- leucemia mielomonocítica crônica
MLST	- <i>Multilocus Sequence Typing</i>
mm	- milímetro
mM	- milimol
n.	- número
NaCl	- cloreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
ng	- nanograma
nM	- nanomol
NTSYS	- <i>Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs</i>
p.	- página
pb	- pares de bases

PCR	- reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	- eletroforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
pH	- potencial hidrogênio-iônico
PM	- peso molecular
pM	- picomol
PMM	- marcadores microsatélite polimórficos (<i>Polymorphic Microsatellite Markers</i>)
q.s.p.	- quantidade suficiente para
RAPD	- DNA polimórfico amplificado ao acaso (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
rDNA	- DNA ribossômico
RFLP	- restrição de fragmentos polimórficos (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SDS	- dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
snPCR	- <i>semi-nested PCR</i>
TBE	- tris borato EDTA
TCA	- tumor de córtex adrenal
TMO	- transplante de medula óssea
TRIS	- tris (hydroximetil) aminometano
TSCU	- transplante de sangue de cordão umbilical
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UPGMA	- <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average</i>
UTI	- unidade de terapia intensiva
UV	- radiação ultravioleta
V	- Volt
v.	- volume
°C	- graus Celsius
x g	- força centrífuga relativa
µg	- micrograma
µl	- microlitro
µm	- micrômetro

RESUMO

A incidência de infecção hematogênica causada por leveduras do gênero *Candida*, denominada candidemia, tem aumentado significativamente nas últimas décadas, acompanhando os avanços na tecnologia médica. O desenvolvimento em transplantes de medula óssea e de tumores sólidos, em quimioterapia e imunossupressão, assim como os cuidados em UTIs, melhoraram as taxas de sobrevivência de pacientes altamente suscetíveis a infecções fúngicas. No Brasil, pesquisas recentes observaram taxas de candidemia de 2,49 casos por 1000 admissões hospitalares. A maior fonte endógena de *Candida* spp. é o trato gastrointestinal, porém há evidências de sua transmissão através das mãos dos atendentes de saúde. *Candida albicans* ainda desempenha importante papel como agente etiológico de candidemia. Entretanto, em todo mundo observa-se mudança na etiologia da doença, e espécies de *Candida* não-*albicans* têm sido cada vez mais descritas como causadoras de candidemia. Isolados de *Candida* spp. armazenados na micoteca do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, obtidos de pacientes pediátricos com candidemia, foram estudados por meio de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Um total de 45 isolados foi recuperado, proveniente de 30 pacientes com pelo menos uma hemocultura positiva para *Candida* spp., durante o período de fevereiro de 1999 a janeiro de 2007. A idade dos pacientes variou de 3 dias a 11 anos, sendo 45% do sexo feminino. A distribuição de *C. albicans* foi de 47% e a de *Candida* não-*albicans* foi de 53%. Entre as espécies não-*albicans*, *C. parapsilosis* (75%) e *C. guilliermondii* (21%) foram as mais frequentes. A análise da variabilidade genética revelou vários agrupamentos com similaridade genética acima de 70% e valores de *bootstrap* elevados, especialmente entre isolados de *Candida parapsilosis* provenientes da UTI Neonatal. Estes achados estão de acordo com outros estudos em populações pediátricas. O uso de marcadores moleculares RAPD se mostrou um método eficiente para estudo epidemiológico de candidemia. A redução da ocorrência de candidemia nosocomial, especialmente entre pacientes de alto risco, depende de amplos estudos epidemiológicos e programas de vigilância.

Palavras-chave: *Candida* spp., candidemia, RAPD.

ABSTRACT

The incidence of hematogenous infection due to *Candida* yeasts, so called candidemia, has increased over the last decades following medical technological advances. Developments in bone marrow and solid-organ transplantation, chemotherapy and immunosuppression, and care in intensive care units have improved the survival rates of patients highly susceptible to fungal infections. A Brazilian surveillance detected 2.49 candidemia cases per 1,000 hospital admissions. The major endogenous source of *Candida* spp. is the gastrointestinal tract but there is evidence that this yeast may be transmitted by the hands of health care workers. *Candida albicans* still plays an important role as etiologic agent for candidemia. However, all over the world the proportion caused by non-*albicans* species is increasing. This study was conducted to analyze *Candida* spp. samples from a yeast stock collection, and isolated from pediatric patients from Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná, using *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Forty-five samples were retrieved from 30 patients with at least one positive blood culture for *Candida* spp., in the period between February 1999 and January 2007. Patients' age ranged from three days to eleven years-old, and 45% were female. *C. albicans* accounted for 47% while *Candida* non-*albicans* accounted for 53%. Among non-*albicans* species, *C. parapsilosis* accounted for 75%, and *C. guilliermondii* accounted for 21%. The genetic variability analysis showed several clusters with genetic similarities over 70% and high *bootstrap* values, mainly among *C. parapsilosis* samples from neonatal intensive care unit. These findings agree with previous studies on pediatric populations. According to the results obtained, RAPD was considered an efficient tool on candidemia epidemiology study. Continuously epidemiologic and surveillance programs are needed in order to reduce nosocomial candidemia, particularly in high risk patients.

Key-words: *Candida* spp., candidemia, RAPD.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são os agentes mais frequentemente envolvidos em infecções fúngicas invasivas nosocomiais. A incidência destas infecções tem aumentado, em paralelo com os avanços na tecnologia médica. Pacientes severamente imunocomprometidos, que são altamente suscetíveis a infecções fúngicas invasivas, apresentam atualmente melhores taxas de sobrevida. Entretanto, nestes pacientes as micoses invasivas geralmente são severas, progridem rapidamente e são difíceis de diagnosticar e tratar. Portanto, o óbito é comum, não devido à doença de base, mas como resultado da infecção fúngica profundamente instalada (TORTORANO *et al.*, 2004). A infecção hematogênica causada por espécies do gênero *Candida* é denominada candidemia, e sua ocorrência tem aumentado significativamente nas últimas décadas, em diferentes partes do mundo (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ROILIDES *et al.*, 2003; TORTORANO *et al.*, 2004).

É importante observar as variações geográficas e sazonais na distribuição das espécies de *Candida* que causam infecções hematológicas. Nos Estados Unidos, *Candida* spp. representam a quarta causa mais comum de infecções hematológicas, contribuindo com 8 a 10% de todas as infecções hematológicas nosocomiais (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Ainda nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade associada à candidemia pode chegar a 50%, sendo que quase 80% destas infecções ocorrem em unidades de terapia intensiva (CLARK, *et al.*, 2004). Em neonatos, as espécies de *Candida* são o terceiro patógeno mais comum em infecções hematológicas nosocomiais, e estão associadas com a segunda maior taxa de mortalidade (SMITH; STEINBACH; BENJAMIN Jr., 2005). Além da mortalidade, a candidemia está associada ao aumento da estadia no hospital e ao aumento dos custos médicos (CHENG *et al.*, 2005). Na Europa, um estudo epidemiológico mostrou infecções da corrente sanguínea causadas principalmente por *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, sendo que crianças com menos de um ano representaram 7,6% dos casos (TORTORANO *et al.*, 2004). No Brasil, um amplo estudo recente revelou a importante carga das candidemias em hospitais terciários. Foram observadas taxas de 2,49 casos por 1.000 admissões

hospitalares, o que é 2 a 15 vezes superior aos dados reportados para centros no hemisfério norte. (COLOMBO *et al.*, 2006). Em outro estudo foi observado que a população pediátrica está mais exposta a fatores de risco como a estadia prévia em UTI, a necessidade de procedimentos invasivos e transfusões, nutrição parenteral total e uso de antibióticos de amplo espectro (PASQUALOTTO *et al.*, 2005).

O padrão ouro atual de diagnóstico de candidemia é a hemocultura (BENJAMIM Jr. *et al.*, 2003; MOREIRA, 2005; ZAOUTIS *et al.*, 2005). Seguindo o achado de uma hemocultura positiva para *Candida* spp., é preciso caracterizar morfológica e bioquimicamente as espécies. É necessário identificar os pacientes em risco de infecção por *Candida albicans* ou *Candida* não-*albicans* a fim de iniciar terapia empírica. Contudo, a metodologia tradicional apresenta algumas limitações, como o tempo de trabalho e o poder de discriminação dos métodos utilizados, e tornou-se necessário a utilização de técnicas de identificação mais rápidas e precisas (OTERO *et al.*, 1995; RESENDE *et al.*, 2004). Estudos taxonômicos utilizando marcadores moleculares possibilitaram um aprimoramento nas técnicas de diagnóstico, além de fornecer dados precisos a respeito das características genotípicas e da variabilidade genética existente entre as espécies e dentro de uma mesma espécie de *Candida*. Atualmente, técnicas como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que utilizam o princípio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), têm sido usadas na identificação de leveduras e em estudos epidemiológicos (LEHMANN; LIN; LASKER, 1992; ROBERT *et al.*, 1995; CLEMONS *et al.*, 1997; BAUTISTA-MUÑOZ *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2004).

O presente estudo retrospectivo foi conduzido com base na população pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com a finalidade de melhor compreender a epidemiologia da candidemia e a diversidade genética dos agentes etiológicos causadores da doença. Amostras de *Candida* spp. isoladas de hemoculturas dos referidos pacientes, e armazenadas em micoteca, foram analisadas por meio de critérios morfológicos e caracterizadas por meio de marcadores moleculares RAPD.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudo microbiológico e molecular de isolados de *Candida* spp., obtidos de pacientes pediátricos, com candidemia, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Confirmar a identificação de isolados de *Candida* spp., obtidos de pacientes pediátricos com candidemia, mantidos na micoteca do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.
- b) Verificar a prevalência de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* como agentes de candidemia em pacientes pediátricos.
- c) Investigar o perfil da variabilidade genética dos isolados, por meio de marcadores RAPD.
- d) Agrupar os isolados de *Candida* spp. de acordo com sua similaridade genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS DE CANDIDEMIA E SUA IMPORTÂNCIA

Existem mais de 17 espécies de *Candida* causadoras de candidíases invasivas em humanos. Apesar de mais de 90% das infecções invasivas por *Candida* spp. serem atribuídos a cinco espécies – *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, a lista de espécies continua aumentando à medida que os laboratórios são cada vez mais estimulados a oferecer métodos de identificação para aperfeiçoar as terapias de tratamento para candidemia (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

2.1.1 *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura que está classificada taxonomicamente no reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Ascomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae* (DIEZMANN *et al.*, 2004). É o patógeno humano mais comumente encontrado, causador de infecções de pele e mucosa em indivíduos saudáveis e de infecções graves em pacientes severamente imunocomprometidos. Foi um dos primeiros patógenos eucarióticos a ter o genoma sequenciado, fato que acelerou as pesquisas relacionadas à biologia deste importante patógeno (JONES *et al.*, 2004; MAGEE; MAGEE, 2005). Trata-se de uma levedura imperfeita que existe de forma comensal com uma grande variedade de animais. Apresenta capacidade de transição da fase de levedura para hifa (transição dimórfica) e uma variedade de transições fenotípicas, desde diferenças na morfologia da colônia até diferenças na forma da célula, e permeabilidade ou suscetibilidade a agentes antifúngicos (instabilidade fenotípica). Estas propriedades são importantes no processo de patogênese. Além disso, outros fatores de virulência sugeridos seriam as habilidades de resistir à fagocitose, aderir às células epiteliais, secretar uma proteinase ácida e crescer bem à temperatura de 37 °C (SCHERER; MAGEE, 1990). De acordo com Abi-Said *et al.* (1997), infecções causadas por *C. albicans* são mais frequentemente observadas em pacientes com número normal de neutrófilos.

C. albicans é naturalmente resistente a uma grande variedade de antibióticos (SCHERER; MAGEE, 1990). Por outro lado, raramente apresenta

resistência a antifúngicos, especialmente anfotericina B e fluconazol (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Diversos estudos demonstram que *C. albicans* continua a desempenhar papel dominante como causa de candidemia, apesar de sua frequência variar grandemente de acordo com a região considerada (PFALLER *et al.*, 2001; BUKHARIE, 2001; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GODOY *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006). De acordo com Pfaller e Diekema (2007), em seu artigo de revisão, a frequência de ocorrência de infecções hematogênicas esta espécie varia de 37% na América Latina a 70% na Noruega.

Godoy *et al.* (2003) realizaram um estudo multicêntrico em quatro países da América Latina, e observaram que *C. albicans* foi o agente etiológico de candidemia mais frequente (40%) em hospitais terciários. Smith, Steinbach e Benjamin Jr. (2005) ressaltam que, assim como ocorre com a população adulta, *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada na população neonatal, apesar da porcentagem de casos ter diminuído de 80% para 40% em alguns centros.

Segundo dados da Rede Candidemia Brasil, a proporção de casos de candidemia devidos a *C. albicans* variou entre 27 e 54% nos 11 centros avaliados. O estudo foi realizado nas regiões sul, sudeste e central, envolvendo adultos e crianças (COLOMBO *et al.*, 2006).

Em Curitiba, *C. albicans* ocorreu em 59% dos episódios de candidemia no HC-UFPR. O estudo avaliou dados da população adulta (n=33) e pediátrica (n=26), durante um período de quatro anos (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008).

2.1.2 *Candida* não-*albicans*

Em todo o mundo vários estudos têm relatado mudanças na etiologia da candidemia e espécies não-*albicans* têm sido descritas cada vez mais como causadoras de infecções hematogênicas (PFALLER *et al.*, 2001; BUKHARIE, 2001; GODOY *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006).

Um estudo retrospectivo com adultos na Itália, incluindo 182 episódios de candidemia, mostrou que *Candida* não-*albicans* foi mais frequente em pacientes mais idosos e com tumores sólidos. O estudo revelou que 47% dos episódios foram causados por *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (BASSETTI *et al.*, 2006). Resultados de um estudo de vigilância com base populacional, realizado na

Espanha, também apontaram dados semelhantes. Foram avaliados 345 casos, e as infecções por espécies não-*albicans* (49%) foram causadas por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (ALMIRANTE *et al.*, 2005).

Bukharie (2001) analisou retrospectivamente 32 casos de candidemia em um hospital-escola na Arábia Saudita. Foram encontradas predominantemente cepas de *Candida* não-*albicans* (81%), e *C. parapsilosis* foi a principal causa de candidemia.

Na América Latina, um estudo multicêntrico realizado por Godoy *et al.* (2003) envolvendo quatro países, entre os quais o Brasil, demonstrou que quase 60% de todos os casos de candidemia foram causados por *Candida* não-*albicans*, e foram representados principalmente por *C. tropicalis* (24,2%) e *C. parapsilosis* (21,3%).

No Brasil, Colombo *et al.* (1999) encontraram 63% de candidemias causadas por *Candida* não-*albicans* em um estudo que envolveu seis hospitais terciários. Barberino *et al.* (2006) realizaram um estudo retrospectivo em três hospitais privados de Salvador (Bahia) e entre os 69 casos de candidemia avaliados foi observada a predominância de espécies não-*albicans*.

Em outro estudo multicêntrico brasileiro, Colombo *et al.* (2006) afirmaram que as razões para a emergência de espécies não-*albicans* ainda não são completamente entendidas, mas algumas condições médicas podem ser importantes para o risco de desenvolvimento de candidemia. Desta forma, a fungemia por *C. parapsilosis* está associada à presença de cateter vascular e à nutrição parenteral, *C. tropicalis* está associada com câncer e neutropenia, e as candidemias por *C. krusei* e *C. glabrata* estão associadas à exposição prévia a antifúngicos azólicos. O mesmo estudo demonstrou que, nos 11 hospitais terciários participantes, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* somaram 70% das espécies não-*albicans*.

A *C. parapsilosis* faz parte da microbiota endógena do ser humano. É um organismo comensal da pele, e penetra na corrente sanguínea através da ruptura da barreira cutânea (DURÁN *et al.*, 2005). Outras características desta espécie incluem a grande capacidade de formar biofilme em soluções glicosiladas e de aderir a materiais plásticos, como cateteres (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PASQUALOTTO *et al.*, 2005; BASSETTI *et al.*, 2006; MEDRANO *et al.*, 2006). Portanto, seu papel como patógeno exógeno adquirido tem sido associado com alimentação parenteral, com a presença de dispositivos intravasculares e com a

contaminação cruzada, devido ao carreamento através das mãos dos profissionais de saúde (BASSETTI *et al.*, 2006; MEDRANO, *et al.*, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Nos Estados Unidos foi observado que *C. parapsilosis* é a segunda mais comum na corrente sanguínea de neonatos, sendo predominante em algumas UTIs neonatais. O fato poderia ser explicado pela presença do patógeno nas mãos dos profissionais de saúde (SMITH; STEINBACH; BENJAMIN Jr., 2005). Ainda nos Estados Unidos, CLARK *et al.* (2004) observaram um grande surto de candidemia por *C. parapsilosis* em adultos, de causa multifatorial. Entretanto, foi possível relacionar pelo menos um isolado do patógeno à colonização encontrada nas mãos de um dos funcionários, através da análise de padrões de *fingerprints*.

Almirante *et al.* (2005), na primeira descrição de candidemia em uma população da Espanha, também encontraram *C. parapsilosis* mais frequentemente em neonatos, além de estar associada com a presença de cateter venoso central. Pfaller *et al.* (2001) concluíram, após 36 meses de estudo junto ao programa SENTRY de vigilância internacional de candidemia, que esta espécie é a segunda causadora de candidemias na América Latina, Canadá e Europa. Salientaram, ainda, que a alta frequência provavelmente seja devida a problemas no cuidado com os cateteres e com o controle de infecção hospitalar.

No Brasil, um estudo em um hospital terciário apontou *C. parapsilosis* como a principal causa de candidemia em pacientes pediátricos (38,5%) (PASQUALOTTO *et al.*, 2005). Em outro hospital terciário, no nordeste do Brasil, um estudo evidenciou a importância desta espécie em episódios de candidemia, uma vez que foi o principal patógeno isolado durante dois anos de pesquisa, e apresentou a segunda maior taxa de mortalidade (MEDRANO *et al.*, 2006).

Estudo recente conduzido no HC-UFPR (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008) encontrou 15% de episódios de candidemia causados por *C. parapsilosis* na população pediátrica. Por outro lado, na população adulta apenas 5% dos casos foram causados por esta espécie.

Um importante agente etiológico de candidemia em pacientes com neutropenia e com doenças hematológicas malignas é a *C. tropicalis* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Em seu artigo de revisão Pfaller e Diekema (2007) relataram que na América do Norte as infecções por *C. tropicalis* representam a quarta causa de candidemia (7%), enquanto na América Latina esta espécie representa a

segunda causa mais frequente da doença (20%). Confirmando estes dados, Godoy *et al.* (2003) encontraram *C. tropicalis* como a segunda espécie mais frequentemente isolada (24,2%) em um estudo multicêntrico na América Latina. No referido estudo foram coletadas 103 amostras de *Candida* spp. de pacientes com candidemia, em cinco hospitais de quatro países latinos, entre os quais o Brasil.

Esta espécie foi identificada como a segunda causadora de candidemia no HC-UFPR, entre 2001 e 2004, predominantemente entre adultos (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008).

A epidemiologia de *C. tropicalis* em neonatos não é clara, mas o seu potencial de transmissão nosocomial deve ser considerado. A afirmação tem respaldo no estudo realizado por Roilides *et al.* (2003) em uma UTI neonatal da Grécia, onde foram encontrados 17 bebês colonizados por esta espécie, provavelmente devido à infecção cruzada.

Nos Estados Unidos, *C. glabrata* emergiu como um importante patógeno oportunista nos Estados Unidos, tendo sido relatada como a segunda causa de candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Por outro lado, na América Latina, um estudo multicêntrico do qual participaram cinco hospitais terciários envolvendo quatro países, demonstrou que a incidência de *C. glabrata* é baixa (7,5%), diferentemente da situação nos Estados Unidos e Europa (GODOY *et al.*, 2003). Estes dados são consistentes com o artigo de revisão de Pfaller e Diekema (2007). Outro aspecto interessante da epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Entretanto, em neonatos, nos quais a exposição à fluconazol profilático é rara, esta espécie é menos comum do que em adultos (SMITH; STEINBACH; BENJAMIN Jr., 2005).

A espécie *C. krusei* é um dos patógenos emergentes mais frequentes, especialmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas ou submetidos a transplante de medula óssea (ABBAS *et al.*, 2000; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Apresenta resistência natural a fluconazol, e muitas infecções causadas por este organismo estão relacionadas ao uso profilático ou terapêutico deste antifúngico (ABBAS *et al.*, 2000; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

De acordo com Pfaller e Diekema (2007), *C. guilliermondii* é uma espécie relativamente incomum de *Candida*, que tem aparecido com a frequência aumentada como agente etiológico de candidemia. *C. guilliermondii* faz parte da

microbiota normal da pele e das superfícies mucosas do ser humano (GIRMENIA *et al.*, 2006). Como agente de candidemia, aparece descrita na maioria dos casos relacionada a pacientes com câncer (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Um estudo na Itália analisou retrospectivamente os casos de candidemia registrados durante um período de 22 anos. Foram encontrados 29 episódios (11,7%) causados por *C. guilliermondii*, todos em pacientes com doenças hematológicas oncológicas. Além disso, foi observado que estas infecções são clinicamente similares às aquelas causadas por *C. parapsilosis*, e que a invasão de ambas as espécies está relacionada à presença de cateter venoso central (GIRMENIA *et al.*, 2006). Recentemente, em um estudo prospectivo multicêntrico brasileiro, foram encontrados 17 casos de candidemia por *C. guilliermondii* (2,4%) (COLOMBO *et al.*, 2006).

C. dubliniensis é uma espécie que apresenta características morfológicas e bioquímicas muito semelhantes a *C. albicans*. A identificação e a diferenciação fenotípica entre as duas espécies é trabalhosa, sendo necessário a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las. Aparentemente *C. dubliniensis* é menos patogênica que *C. albicans*, mas tem maior facilidade em desenvolver resistência a azólicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003), e tem sido isolada, principalmente, em pacientes com infecção por HIV (MARIANO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

Mariano *et al.* (2003) desenvolveram um estudo com amostras provenientes de uma micoteca da Universidade de São Paulo, entre 1994 e 2000. Foram isoladas 548 amostras de fluidos corporais de pacientes HIV positivos e negativos, inicialmente identificados como *C. albicans*, e, após análise pela técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), foram confirmadas 11 amostras de *C. dubliniensis*. Também utilizando a técnica de RAPD, Bautista-Muñoz *et al.* (2003) evidenciaram diferentes perfis entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* em amostras obtidas de quatro laboratórios microbiológicos do México. Silva *et al.* (2003) realizaram, no Chile, um estudo semelhante com 47 cepas provenientes de hemoculturas de pacientes adultos e pediátricos. O resultado foi a identificação de apenas um isolado como *C. dubliniensis*, proveniente de uma criança, caracterizando o primeiro caso documentado da espécie no Chile.

Colombo *et al.* (2003) conduziram um estudo retrospectivo para avaliar um surto de candidemia nosocomial causado por *C. rugosa*. Foram identificados seis casos durante o curso de um estudo multicêntrico brasileiro (COLOMBO *et al.*,

1999), e todos ocorreram em pacientes da mesma UTI de um hospital terciário. Os autores concluíram que esta espécie é um patógeno nosocomial da corrente sanguínea, que pode aparecer em surtos esporádicos, geralmente associados com procedimentos médicos invasivos. Além disso, as infecções causadas por *C. rugosa* geralmente são refratárias ao tratamento com anfotericina B e estão associadas com alta mortalidade.

O programa SENTRY de Vigilância Antimicrobiana é o único sistema que monitora infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. e por bactérias, em 74 locais sentinela em 22 nações dos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa (PFALLER *et al.*, 2001). Este programa não menciona dados específicos sobre episódios de candidemia relacionados à *C. lusitaniae*. Segundo Colombo e Guimarães (2003), *C. lusitaniae* tem sido relatada como agente de candidemia em pacientes imunocomprometidos. Recentemente foram identificados dois casos de candidemia devido a este patógeno, um no Brasil e outro na Argentina, durante pesquisa desenvolvida por Godoy *et al.* (2003).

2.2 PATOGÊNESE DA CANDIDEMIA

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos oportunistas reconhecidamente importantes, capazes de infectar pacientes imunocompetentes gravemente doentes e pacientes imunocomprometidos (BUKHARIE, 2001; VRIONI; MATSIOTA-BERNARD, 2001; BAUTISTA-MUÑOZ *et al.*, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Estes microrganismos podem passar da superfície colonizada para o interior de tecidos quando a integridade da mucosa ou da pele é violada, por exemplo, por perfuração do trato gastrointestinal através de trauma, cirurgia ou ulcerações, ou ainda por danos nas mucosas devido a agentes citotóxicos usados em quimioterapia para câncer (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; BENNET, 2005).

Apesar de *Candida* spp. não ser residente normal da pele, as secreções da boca, do reto ou da vagina, assim como drenagem de feridas cirúrgicas, podem contaminar a pele ou cateteres. O abuso de drogas intravenosas ou queimaduras de terceiro grau também fornecem acesso para *Candida* da pele, levando à candidíase invasiva. Uma vez ultrapassada a barreira tegumentar, neonatos de peso muito baixo, assim como a neutropenia e a terapia com glicocorticóides, comprometem a defesa do organismo (BENNET, 2005).

Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições (TAMURA *et al.*, 2007). A virulência da *Candida* está relacionada a diferentes fatores, sendo o principal a sua capacidade de adesão às células epiteliais, que ocorre principalmente pela presença de hifas e tubos germinativos, no caso da espécie *C. albicans*. Diferentes cepas de *C. albicans* podem apresentar níveis variáveis de virulência (ODDS, 1987). Sabe-se que o poder de adesão dos tubos germinativos é maior, o que provavelmente explique a prevalência de colonização por *C. albicans* e seu maior potencial patogênico. As hifas e pseudo-hifas, próprias de algumas espécies de *Candida*, podem ter comprimento maior que 200 µm, o que dificulta a fagocitose, principal meio de defesa do organismo contra este tipo de infecção. Algumas espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, são produtoras de enzimas hidrolíticas, como as proteinases ácidas e as fosfolipases, que facilitam sua penetração no tecido subjacente. Também produzem ácidos, em especial o piruvato e o lactato, que baixam o pH do meio e ativam as enzimas ácidas (ODDS, 1987). Outros fatores de virulência incluem a manutenção da integridade da parede celular e a fuga da resposta imune do hospedeiro (FU *et al.*, 2008).

A maioria dos casos de candidemia caracteriza uma infecção endógena, ocorrendo translocação do patógeno principalmente através do trato gastrointestinal, onde existe colonização por *Candida* spp. em 70% da população normal (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ROILIDES *et al.*, 2003). Entretanto, pode ocorrer infecção cruzada de fonte exógena, através do contato das mãos dos profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres vasculares, implantes de próteses contaminados, e, também, pela administração parenteral de soluções contaminadas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SAN MIGUEL *et al.*, 2004).

Pacientes com candidemia geralmente apresentam uma síndrome séptica aguda indistinguível de bacteremia, mas que pode manifestar um curso mais lento devido à febre. Segundo Colombo *et al.* (1999), em seu estudo multicêntrico, febre foi a manifestação clínica mais frequente de candidemia, ocorrendo em 83% dos pacientes. O quadro clínico de pacientes com sepse causada por *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* é indistinto. Entretanto, as espécies não-*albicans* geralmente são menos suscetíveis a fluconazol do que *C. albicans*, podendo ser necessária uma dose maior do medicamento para cura clínica (CHENG *et al.*, 2005).

Em neonatos a sepse fúngica está se tornando frequente no período neonatal, principalmente entre recém-nascidos de peso muito baixo (MOREIRA, 2005). É sabido, também, que a exposição dos neonatos ocorre via transmissão horizontal, vertical e por infecção cruzada (FRIDKIN *et al.*, 2006), e que a incidência de candidemia em bebês de peso extremamente baixo (< 1000 g) varia de 4 a 15% (BENJAMIN Jr. *et al.*, 2003).

A seleção de agentes antifúngicos para o tratamento das candidemias é de extrema importância, e testes de suscetibilidade *in vitro* desempenham importante papel em estudos epidemiológicos de resistência e também no desenvolvimento de novas drogas. A anfotericina B já foi considerada o antifúngico padrão ouro por sua ampla atividade, e a maioria das espécies de *Candida* apresenta suscetibilidade a esta droga. Entretanto, *C. glabrata* e *C. krusei* são exemplos de espécies menos suscetíveis em comparação com *C. albicans* (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Estudo realizado nos Estados Unidos demonstrou que, em UTIs neonatais, a anfotericina B permaneceu como agente antifúngico primário durante o período de estudo (FRIDKIN *et al.*, 2006).

Atualmente existem várias alternativas à anfotericina B, que são igualmente eficientes e menos tóxicas. Os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) são seguros e eficazes para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. Porém, o amplo uso destes agentes, especialmente fluconazol, tem despertado preocupação quanto à emergência de espécies resistentes. A classe das equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) representa agentes fungicidas com atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, incluindo espécies resistentes a azólicos (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

A prevenção e a profilaxia da candidemia envolvem várias frentes de ação: identificação dos fatores de risco a fim de diminuir a exposição do paciente; controle das doenças de base; redução da duração da antibioticoterapia; uso profilático de agentes antifúngicos; implementação de estratégias relacionadas ao uso e cuidados com cateteres venosos centrais; intensificação de protocolos de lavagem e desinfecção das mãos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Smith, Steinbach e Benjamin Jr. (2005) ressaltam ainda a importância do tratamento adequado de infecções do trato urinário e vaginites durante a gestação, diminuindo o risco de transmissão vertical para o neonato.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

A identificação clássica das leveduras do gênero *Candida* compreende diferentes etapas: isolamento, prova do tubo germinativo, microcultivo e provas bioquímicas de assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de nitrogênio (ODDS, 1987). Ainda é possível fazer a identificação das leveduras através do uso de meios cromogênicos, métodos comerciais e análise de DNA (LEHMANN; LIN; LASKER, 1992; ODDS; BERNAERTS, 1994; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996; GÜNDES; GULENC; BINGOL, 2001; BAUTISTA-MUÑOZ *et al.*, 2003). O isolamento das leveduras do gênero *Candida* é feito em Ágar Sabouraud Dextrose e o seu crescimento é favorecido em temperaturas variando entre 20°C e 38°C e com pH entre 2,5 e 7,5. As colônias de *Candida* são caracterizadas pelo formato esférico, coloração branco-fosca, aspecto de porcelana (brilhante) e cremosas, apresentando diâmetro entre um e oito milímetros e odor característico (BARBIERI, 2005).

A manutenção de culturas de fungos em micotecas permite a realização de estudos epidemiológicos, bem como a obtenção de medicamentos e drogas. O método de repique periódico e subcultivo em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose, por exemplo, é trabalhoso e está sujeito a contaminações. Portanto, há necessidade de novas técnicas para a manutenção da viabilidade dos fungos por longos períodos nas micotecas, a fim de garantir sua utilidade (DIOGO; SARPIERI; PIRES, 2005).

A primeira prova realizada para a identificação das leveduras do gênero *Candida* é a verificação da formação ou não do tubo germinativo. O tubo germinativo é definido como uma extensão filamentosa da célula leveduriforme com metade da largura e comprimento de três a quatro vezes o diâmetro da célula mãe. Pode ser considerado excelente teste para a identificação presuntiva de *C. albicans*, uma vez que o índice de positividade da espécie para este teste é de 94 a 97%. As outras espécies de *Candida*, por exemplo *C. tropicalis*, não produzem tubo germinativo, podendo apresentar prolongamentos que são pseudo-hifas (ODDS, 1987). O microcultivo da levedura em ágar fubá com a substância tensoativa Tween 80, visa diferenciar as estruturas de reprodução assexuada formadas durante o crescimento do fungo. Quando incubadas em baixa tensão de oxigênio, as leveduras do gênero *Candida* podem produzir filamentos, que são as pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras.

Assim, pelas características morfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie de levedura (ODDS; BERNAERTS, 1994).

Além de provas morfológicas são também utilizadas provas de assimilação de carboidratos, que se baseiam na capacidade que as leveduras apresentam de utilizar certos carboidratos como fonte de carbono. A capacidade das leveduras de fermentar determinados açúcares, produzindo gás carbônico, é um parâmetro importante para a diferenciação das espécies (ODDS, 1987).

Os métodos laboratoriais tradicionais para a identificação das diferentes espécies de leveduras são bastante laboriosos e leva-se muito tempo para chegar a um resultado final. Com a finalidade de facilitar este processo existem atualmente diferentes métodos para realizar o processo de identificação. Os mais utilizados na rotina de laboratório são os métodos comerciais, que podem ser manuais ou automatizados, e os meios cromogênicos. Estes métodos são de fácil realização e interpretação, além de oferecer os resultados em menor tempo (GÜNDES; GULENC; BINGOL, 2001). Os meios cromogênicos são utilizados para o isolamento primário de leveduras, que desde seu crescimento inicial demonstram diferentes colorações de colônias, dependendo da espécie. São exemplos de meios cromogênicos: o Albicans ID[®] (bioMérieux), o CHROMagar Candida[®] (CHROMagar Company) e o Hicrome Candida[®] (HIMEDIA). Os meios cromogênicos têm como vantagens a identificação presuntiva das leveduras de forma rápida e a facilidade em detectar culturas mistas, com diferentes espécies de *Candida* (ODDS; BERNAERTS, 1994; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996). Por outro lado, os métodos comerciais têm como princípio básico a assimilação de diferentes carboidratos realizada pelas diferentes espécies de leveduras. A leitura é feita por turvação do meio, reação colorimétrica ou mudança do indicador de pH. São exemplos de métodos comerciais manuais conhecidos: API 20C AUX[®] (bioMérieux), ID 32C[®] (bioMérieux), Fungichrom I[®] (International Microbio), Candifast[®] (International Microbio), entre outros (GÜNDES; GULENC; BINGOL, 2001).

Estratégias sorológicas de identificação consistem, por exemplo, na detecção de moléculas como antígenos. O principal antígeno das espécies de *Candida* é manana. Além de propriedades imunomodulatórias, este antígeno e seus conjugados produzem diferentes classes de anticorpos. Imunoensaios automatizados combinam medidas de mananemia e resposta de anticorpos, como os testes antígeno-anticorpo *Candida*-específico Platelia (BioRad Laboratories). Um

fator limitante é a disponibilidade de amostras de soro coletadas antes do início da infecção, uma vez que o aumento nos títulos sorológicos é indicativo do aumento da carga da levedura (SENDID, B. *et al.*, 2003).

2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Candida* spp.

C. albicans, assim como outras espécies de *Candida*, apresenta DNA extensamente polimórfico, o que levou ao rápido desenvolvimento de uma variedade de técnicas baseadas no DNA para aplicações epidemiológicas (SCHERER; MAGEE, 1990). Os métodos moleculares DNA *fingerprinting* incluem sequenciamento genômico, eletroforese enzimática multilocus, eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE), hibridização com sondas espécie-específicas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (VRIONI; MATSIOTA-BERNARD, 2001; BAUTISTA-MUÑOZ *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2004).

Muitos pesquisadores têm usado diferentes métodos moleculares para demonstrar correlações genéticas e epidemiológicas entre isolados de diferentes espécies de *Candida*. Ahmad *et al.* (2002) desenvolveram um teste denominado *seminested* PCR (snPCR). Os autores empregaram iniciadores universais para fungos com a finalidade de detectar DNA ribossômico (rDNA), incluindo a região ITS2, de 4 espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Em seguida, os amplicons obtidos foram novamente amplificados utilizando iniciadores espécie-específicos juntamente com um iniciador genérico. Os resultados obtidos na identificação com snPCR apresentaram concordância de aproximadamente 90% com a identificação realizada por métodos bioquímicos comerciais. O método se mostrou adequado para diagnóstico de candidemia causada pelas espécies estudadas, além de identificar pacientes infectados com mais de uma espécie de *Candida*.

Bougnoux, Morand e d'Enfert (2002) realizaram experimentos com o método MLST (*Multilocus Sequence Typing*) para caracterizar isolados clínicos de *C. albicans*. Em bactérias, o método é baseado na análise de polimorfismos de nucleotídeos em sequências de aproximadamente 450-500 pb. Para *C. albicans*, a técnica se baseia no sequenciamento de 12 *loci* anônimos. Os pesquisadores

confirmaram a reprodutibilidade do método e a estabilidade genômica dos *loci* estudados, bem como o poder discriminatório de cepas de *C. albicans*.

Com a finalidade de resolver discrepâncias na identificação fenotípica de espécies de *Candida* entre diferentes instituições, Coignard *et al.* (2004) realizaram um ensaio imunoenzimático (*Enzyme Immunoassay* - EIA) colorimétrico, após a utilização de sondas de DNA e iniciadores fungo-específicos. De acordo com os autores, os resultados obtidos foram altamente específicos e de fácil interpretação.

Outra técnica de identificação genotípica consiste na utilização de marcadores microsatélites polimórficos (*Polymorphic Microsatellite Markers* - PMM). Microsatélites são definidos como sequências repetitivas de dois ou três nucleotídeos. Uma vez que a maioria dos microsatélites apresenta polimorfismo entre indivíduos, seu uso é extenso para o mapeamento físico em humanos (Botterel *et al.*, 2001). Eloy *et al.* (2006) utilizaram marcadores microsatélites para descartar a hipótese de contaminação cruzada por *C. albicans* em UTIs de dois hospitais. A técnica permitiu também concluir que não havia um genótipo específico para determinado hospital. Botterel *et al.* (2001) investigaram três marcadores microsatélites polimórficos através de PCR multiplex, a fim de obter um método rápido de identificação para *C. albicans*. Foram analisadas amostras de dois isolados de cada paciente, sendo uma de sangue periférico ou de cateter venoso central, e outra de um sítio anatômico periférico. Foi possível demonstrar que a maioria dos pacientes havia sido infectada com as cepas colonizantes.

A análise molecular através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido utilizada em diferentes métodos. Shin *et al.* (2005) avaliaram isolados de *C. albicans*, associando esta técnica ao cariótipo eletroforético (EK) e à restrição enzimática do DNA genômico. Foi possível determinar os índices discriminatórios dos métodos, a relação epidemiológica entre as amostras, e a identificação de fontes exógenas de contaminação.

A O uso das técnicas de *real-time PCR* e *microarray* em estudos epidemiológicos de candidemia pode diminuir as etapas de manipulação de amostras pós-amplificação, reduzindo consequentemente os riscos de contaminação. Além disso, o tempo total para identificação de amostras seria reduzido (COIGNARD *et al.*, 2004).

A técnica mais usada atualmente, baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), é a técnica de RAPD. Desenvolvida independentemente por dois grupos

de pesquisa (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990), consiste em um processo distinto da PCR convencional, uma vez que é baseado na amplificação do DNA genômico com iniciadores (*primers*) únicos, com nove a dez pares de bases de comprimento, e sequência aleatória de nucleotídeos.

Na reação de RAPD, um iniciador se liga ao DNA genômico em dois sítios diferentes em fitas opostas do DNA molde. Se estes sítios estiverem localizados a uma distância amplificável, observa-se um pequeno produto de DNA. A presença de cada produto de amplificação identifica homologia completa ou parcial de nucleotídeos, entre o DNA genômico e os iniciadores (TINGEY; del TUFO, 1993). Estes iniciadores detectam polimorfismos, que funcionam como marcadores, podendo ser usados para construir mapas genéticos (WILLIAMS *et al.*, 1990).

A maior vantagem da técnica de RAPD é o fato de não necessitar informação prévia sobre a sequência alvo de DNA. Outras vantagens da técnica incluem: a) utilização de pequenas quantidades (nanogramas) de DNA (TINGEY; del TUFO, 1993); b) não utilização de sondas marcadas radioativamente; c) simplicidade da técnica, com alto poder discriminatório (RESENDE *et al.*, 2004); d) possibilidade de reamplificar e clonar bandas cortadas do gel e eluídas, após a corrida eletroforética (McCLELLAND; WELSH, 1994).

O conteúdo de informação de um marcador RAPD individual, assim como a maioria dos marcadores moleculares, é muito baixo. A utilidade do método surge com a análise de vários destes marcadores anônimos para definir um genoma (WILLIAMS *et al.*, 1990). Estes marcadores têm se mostrado adequados para avaliar polimorfismos intra e interespecies, fazer análises populacionais e epidemiológicas, podendo ser aplicados em uma ampla variedade de organismos (WILLIAMS *et al.*, 1990; PINTO *et al.*, 2004). Além disso, as similaridades genéticas obtidas pela técnica de RAPD podem ser utilizadas para analisar surtos hospitalares (RESENDE *et al.*, 2004), bem como a ocorrência de infecções cruzadas (VALÉRIO *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 A INSTITUIÇÃO

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) foi escolhido para a realização deste projeto de pesquisa por ser o único hospital do Paraná que mantém amostras em micoteca. A micoteca do Laboratório de Micologia do HC-UFPR é constituída por amostras isoladas no setor, e armazenadas pela técnica de congelamento a -20°C e em ágar Sabouraud dextrose.

O HC é o hospital-escola da UFPR. Sua capacidade atual é de 643 leitos, e sua atuação em assistência, ensino e pesquisa é amplamente reconhecida. Recentemente o HC-UFPR foi incluído em um estudo epidemiológico multicêntrico de candidemia, denominado Rede Candidemia Brasil, que contou com a participação de outros dez hospitais públicos brasileiros (COLOMBO *et al.*, 2006).

3.2 AMOSTRAS E PERÍODO DE ESTUDO

A partir do arquivo da micoteca, foram selecionados os isolados para este estudo, e a coleção de amostras viáveis foi composta por 45 isolados de colônias de *Candida* spp. (QUADRO 1). Os critérios de seleção foram a viabilidade das culturas e a ausência de contaminação por bactérias, fungos filamentosos ou ácaros. Também foram incluídas quatro linhagens externas ao estudo, como referência, totalizando 49 amostras.

Os isolados selecionados resultaram de hemoculturas positivas para *Candida* spp., provenientes de 30 pacientes pediátricos, internados no HC-UFPR entre fevereiro de 1999 e janeiro de 2007. Três isolados foram obtidos a partir de cateter, e 42 de coleta de sangue periférico. A idade dos pacientes variou de 3 dias a 11 anos, sendo 45% do sexo feminino e 55% do sexo masculino.

As amostras de sangue periférico ou de cateter foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do HC-UFPR, para incubação, em frascos de hemocultura do sistema automatizado BacT/ALERT[®] (Organon Teknika/bioMérieux). Em seguida, no Laboratório de Micologia do HC-UFPR, foi realizada a identificação das leveduras, até o ano de 2002, pelo sistema automatizado WalkAway[®] (Dade Behring), tendo sido substituído pelo sistema Vitek[®] (bioMérieux). A partir de

dezembro de 2005, além de procedimentos clássicos, como auxanograma e presença de tubo germinativo, o laboratório passou a utilizar o sistema API 20C AUX® (bioMérieux).

Nº	ORIGEM	DATA DE ENTRADA	MATERIAL	ESPÉCIE DE <i>Candida</i>
2	UTI Neonatal	20.06.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
4	UTI Neonatal	20.02.06	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
5	UTI Neonatal	13.04.05	Cateter	<i>C. guilliermondii</i>
6	UTI Neonatal	16.04.05	Sangue periférico	<i>C. guilliermondii</i>
7	UTI Neonatal	26.04.05	Sangue periférico	<i>C. guilliermondii</i>
8	UTI Neonatal	15.01.07	Sangue periférico	<i>C. guilliermondii</i>
9	UTI Neonatal	02.02.99	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
10	UTI Neonatal	20.09.04	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
11	UTI Neonatal	30.09.04	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
12	UTI Neonatal	31.01.05	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
13	UTI Neonatal	15.11.05	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
14	UTI Neonatal	17.11.05	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
15	UTI Neonatal	26.09.06	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
16	UTI Neonatal	29.09.06	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
17	UTI Neonatal	15.12.06	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
18	UTI Neonatal	18.12.06	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
19	UTI Neonatal	20.12.06	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
20	UTI Neonatal	04.01.07	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
21	UTI Neonatal	02.05.05	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
22	Risco Intermediário	05.11.04	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
23	Risco Intermediário	11.11.04	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
24	Risco Intermediário	06.05.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
25	Risco Intermediário	06.05.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
26	Risco Intermediário	06.05.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
27	Risco Intermediário	21.05.01	Sangue periférico	<i>C. guilliermondii</i>
28	Risco Intermediário	18.10.04	Cateter	<i>C. pseudotropicalis</i>
29	UTI Pediátrica	21.01.02	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
30	UTI Pediátrica	26.10.03	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
31	UTI Pediátrica	25.03.04	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
32	UTI Pediátrica	18.05.04	Cateter	<i>C. parapsilosis</i>
33	Hematologia Pediátrica	02.12.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
34	Hematologia Pediátrica	30.01.07	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
35	Hematologia Pediátrica	30.01.07	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
36	Hematologia Pediátrica	30.01.07	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
37	Hematologia Pediátrica	02.04.05	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
38	Hematologia Pediátrica	25.01.07	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
40	Hematologia Pediátrica	26.10.04	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
41	Hematologia Pediátrica	23.11.04	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
42	Hematologia Pediátrica	29.11.04	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
43	Hematologia Pediátrica	31.08.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
44	Hematologia Pediátrica	31.08.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
45	Hematologia Pediátrica	02.12.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>
48	Transplante de M.O.	22.03.05	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
49	Transplante de M.O.	07.12.06	Sangue periférico	<i>C. parapsilosis</i>
50	Infectologia Pediátrica	05.01.05	Sangue periférico	<i>C. albicans</i>

QUADRO 1 - ISOLADOS DE *Candida* spp OBTIDOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS DO HC-UFPR DURANTE O PERÍODO DE FEV./1999 A JAN./2007

FONTE: O Autor (2008)

NOTA: M.O. – Medula Óssea

3.3 PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

Informações dos isolados de *Candida* spp. incluídos no estudo foram registradas, anotando-se data de recebimento da amostra e a espécie de *Candida*. Também foram registradas informações dos pacientes dos quais foram isoladas as leveduras: idade, sexo, data de nascimento, unidade de internação no momento do diagnóstico da candidemia, condições clínicas de base e tratamento da candidemia. Estes dados foram obtidos através da análise do arquivo da micoteca, dos prontuários dos pacientes e da consulta ao sistema informatizado do HC-UFPR.

3.4 SUBCULTIVO DE LEVEDURAS

A partir das culturas armazenadas em ágar Sabouraud dextrose, foi feita uma diluição para cada isolado, misturando uma alçada de cada colônia em 1 ml de solução salina. Após homogeneização, foi realizado o repique em estrias em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose, em placa de Petri. As culturas congeladas foram previamente descongeladas à temperatura ambiente, e em seguida igualmente diluídas e repicadas. As amostras foram cultivadas em estufa, a 30 °C, durante 24 a 48 horas.

Todos os isolados identificados como *C. albicans* foram subcultivados em meio de cultura ágar cromogênico (Hicrome Candida[®] - HIMEDIA). Este procedimento foi necessário para eliminar possíveis contaminações, uma vez que houve crescimento de colônias com padrões diferentes. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, durante 24 a 48 horas. O meio de cultura cromogênico é presuntivo para identificação de *C. albicans*, pelo padrão da cor de crescimento das colônias. Colônias com crescimento de cor verde caracterizam *C. albicans*, enquanto colônias de cor azul caracterizam *Candida* não-*albicans*.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

As culturas de *Candida* spp., provenientes dos pacientes com candidemia, foram preparadas para extração de DNA. Foi realizado o subcultivo prévio em meio de cultura BDA, seguido de incubação em estufa a 30 °C, durante 24 horas.

O procedimento de extração de DNA seguiu protocolo adotado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR, modificado de De Hoog *et al.* (2004). Trabalhando sob fluxo laminar, foram transferidas de três a cinco alçadas das culturas para um tubo tipo *ependorf* contendo uma mistura previamente autoclavada de sílica em pó (sílica gel Merck®) e celite 2:1, acrescida de 600 µl de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Em seguida, utilizando disruptor de células ultrassônico (Unique), foram aplicados dois pulsos de ultrassom (30 segundos, potência 70), com intervalos de 30 segundos entre cada pulso, sob banho de gelo. A seguir, foram adicionados 400 µl de tampão CTAB e as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C durante 10 minutos. Após esta etapa, as amostras foram mantidas em fluxo laminar até atingir temperatura ambiente, e foram adicionados 1000 µl de clorofórmio. Seguiu-se a centrifugação a 15300 x g, durante sete minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *ependorf*, ao qual foram adicionados mais 1000 µl de clorofórmio e foi repetida a etapa de centrifugação. Mais uma vez o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *ependorf*, foram adicionados 2000 µl de álcool a 96% (a -4 °C), e então os tubos foram incubados a -20 °C, durante 24 horas, para precipitação dos ácidos nucléicos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 15300 x g, durante sete minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool a 70% a -4%. Repetiu-se a centrifugação a 15300 x g, durante sete minutos. O álcool foi retirado e os tubos vertidos, permanecendo em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado (15 a 20 minutos). Posteriormente, foram adicionados 50 µl de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante 24 horas e em seguida armazenados a -4°C. A integridade das amostras foi verificada após eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, e visualização em transiluminador UV.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR RAPD-PCR

As reações de RAPD foram conduzidas em volume final de 12,5 µl, contendo tampão 1X (INVITROGEN®), 3 mM de MgCl₂ (INVITROGEN), 0,2 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP (GE Healthcare Life Sciences®), 0,4 µM de

oligonucleotídeo iniciador (*primer*) (OPERON TECHNOLOGIES®), 0,06 U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN®) e 12 ng de DNA genômico. Os parâmetros de amplificação consistiram de 40 ciclos de desnaturação a 92 °C durante 60 segundos, anelamento dos iniciadores a 37 °C durante 90 segundos e extensão a 72 °C durante 120 segundos. No início houve um ciclo de desnaturação a 92 °C durante 4 minutos, e ao final do programa um ciclo de extensão a 72 °C durante 3 minutos. As reações foram realizadas em termociclador TECHNE® (modelo TC412), e as sequências dos iniciadores estão apresentadas no Quadro 2.

Iniciadores	Sequência 5' – 3'
OPX12	-TCGCCAGCCA-
OPX14	-ACAGGTGCTG-
OPX17	-GACACGGACC-
OPX19	-TGGCAAGGCA-

QUADRO 2 - SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD
FONTE: OPERON TECHNOLOGIES®

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,4 %, contendo brometo de etídio (0,5 µg/µl), em tampão TBE1X (Tris-base, ácido bórico, EDTA 0,5 M, pH 8,0). A corrida eletroforética foi realizada a 2,6 V/cm, durante 2 horas e 30 minutos, a 120V. Em seguida o gel foi fotografado sob iluminação UV, utilizando sistema de fotodocumentação VILBER LOUMART®.

O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação direta com o marcador de peso molecular (100 bp *DNA Ladder*, FERMENTAS *Life Sciences*®).

3.8 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Para a análise do polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, foi utilizado o *software* NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) de acordo com os princípios adotados em taxonomia numérica (ROHLF, 1988). As bandas resultantes da amplificação foram analisadas com base em variáveis binárias, onde 0 indica ausência de banda e 1 indica presença. Utilizando o *software* NTSYSpc 2.1, a partir da matriz binária obtida, foi construída uma matriz de

similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J). Este coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias. As bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula $J=M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos as concordâncias negativas (SNEATH; SOKAL, 1973).

A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), para a construção dos dendrogramas. A confiabilidade dos grupamentos foi verificada pela análise *bootstrap* com 10.000 reamostragens, segundo descrito por Felsenstein (1985) utilizando o *software* Bood 3.03 (COELHO, 2005). Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 75%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREVALÊNCIA DE *Candida albicans* E *Candida* não-*albicans* COMO AGENTES DE CANDIDEMIA.

A distribuição de *C. albicans* nos isolados obtidos de pacientes pediátricos avaliados foi de 47%, e a de *Candida* não-*albicans* foi de 53%, considerando-se o número total de isolados obtidos (QUADRO 3). Estes dados estão de acordo com os valores observados para outros hospitais terciários brasileiros, onde há predominância de candidemia causada por *Candida* não-*albicans* (COLOMBO *et al.*, 1999). Ainda com relação à distribuição de *Candida* não-*albicans*, é possível notar que, do total de 24 amostras, mais de 75% são representados por *C. parapsilosis* e 21% por *C. guilliermondii*. A tendência à predominância de *C. parapsilosis*, especialmente na UTI Neonatal, também está de acordo com outras pesquisas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PASQUALOTTO *et al.*, 2005; MEDRANO *et al.*, 2006). *C. parapsilosis* tem capacidade de proliferar em soluções contendo glicose, de produzir biofilme e colonizar a pele e cateteres, sendo sua ocorrência grande em recém-nascidos, prematuros e internados em UTI (BASSETTI *et al.*, 2006; MEDRANO, *et al.*, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Espécie		Nº de amostras	% do total
<i>Candida albicans</i>		21	47
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i> :			
	<i>C. parapsilosis</i>	18	40
	<i>C. guilliermondii</i>	5	11
	<i>C. pseudotropicalis</i>	1	2
Total		45	100

QUADRO 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida* EM RELAÇÃO AO NÚMERO TOTAL DE ISOLADOS
 FONTE: O Autor (2008)

Os dados referentes às condições clínicas dos pacientes com candidemia foram analisados através de consulta aos prontuários dos pacientes e ao SIH (sistema informatizado do HC-UFPR). A finalidade da análise foi identificar a presença de fatores de risco para candidemia. De acordo com Pfaller e Diekema (2007), os principais fatores de risco para candidíases invasivas e candidemia incluem exposição a antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, colonização de

mucosas por *Candida* spp., presença de cateter venoso central, nutrição parenteral total, neutropenia, procedimentos cirúrgicos (especialmente gastrintestinais), e falha renal ou hemodiálise.

O maior número de pacientes expostos a fatores de risco para candidemia foi observado na UTI Neonatal (QUADRO 4). Nesta unidade, entre os 13 pacientes, 12 receberam antibióticos de amplo espectro e 11 receberam nutrição parenteral total. A condição clínica predominante nos pacientes desta unidade foi a prematuridade, sendo que 6 entre 10 nasceram com menos de 1000 g. Estas informações estão em conformidade com os achados de *C. parapsilosis*, patógeno que vem sendo frequentemente encontrado como agente etiológico de candidemia em neonatos (SMITH; STEINBACH; BENJAMIN Jr., 2005; ALMIRANTE *et al.*, 2005).

UI (nº de pacientes)	Faixa etária	Gênero	Doenças de base	Atb amplo	CVC	NPT	QT	Cirurgia
Hematologia Pediátrica (7)	2 a 8 anos	Masculinos: 5 Feminino: 2	LLA, LMA, LMMC, TCA, Meduloblastoma, Anemia hemolítica	2	1	1	5	1
Infectologia Pediátrica (1)	7 anos	Masculino: 1	HIV +	1	*	*	*	*
Risco Intermediário (3)	27 dias a 3 meses	Masculino: 3	Prematuros (32 a 36 semanas de gestação)	3	*	3	0	2
TMO (2)	4 a 11 anos	Feminino: 2	LMA, Anemia de Fanconi	1	2	*	1	*
UTI Neonatal (13)	3 a 51 dias	Masculino: 6 Feminino: 7	Prematuros (6/10 <1000 g)	12	1	11	1	3
UTI Pediátrica (4)	2 meses a 2 anos	Masculino: 1 Feminino: 3	Desnutrição, septicemia, fibrose cística	2	2	3	0	3

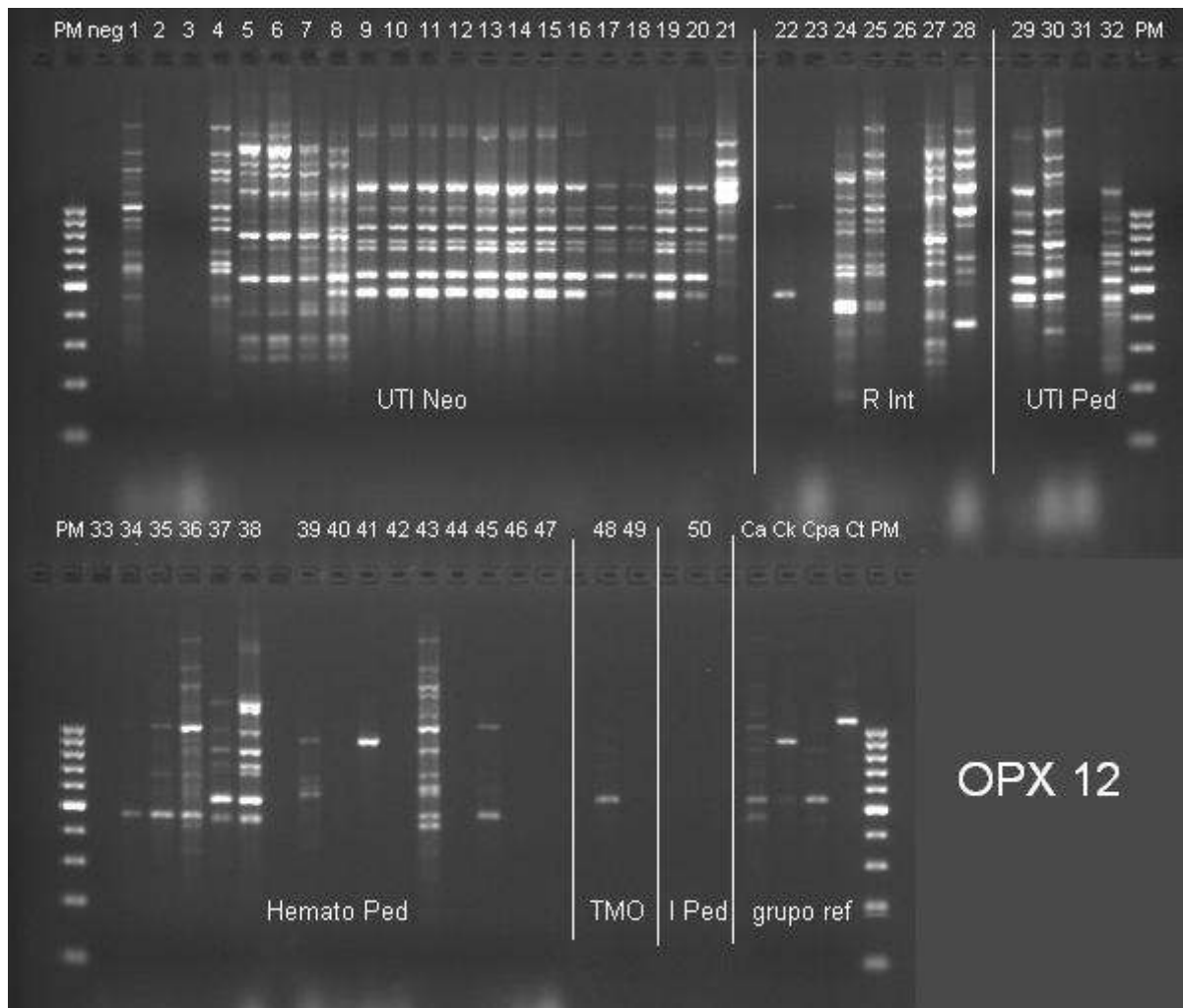
QUADRO 4 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA DO HC-UFPR INCLUÍDA NO ESTUDO, COM RELAÇÃO A FATORES DE RISCO PARA CANDIDEMIA

FONTE: O autor, com base nos prontuários dos pacientes e no SIH.

NOTA: UI-unidade de internação; TMO-Transplante de Medula Óssea; LLA-leucemia linfóide aguda; LMA-leucemia mielóide aguda; LMMC-leucemia mielomonocítica crônica; TCA-tumor de córtex adrenal; HIV-vírus da imunodeficiência humana; Atb amplo-uso de antibiótico de amplo espectro; CVC-presença de cateter venoso central; NPT-nutrição parenteral total; QT-quimioterapia; * informações não obtidas

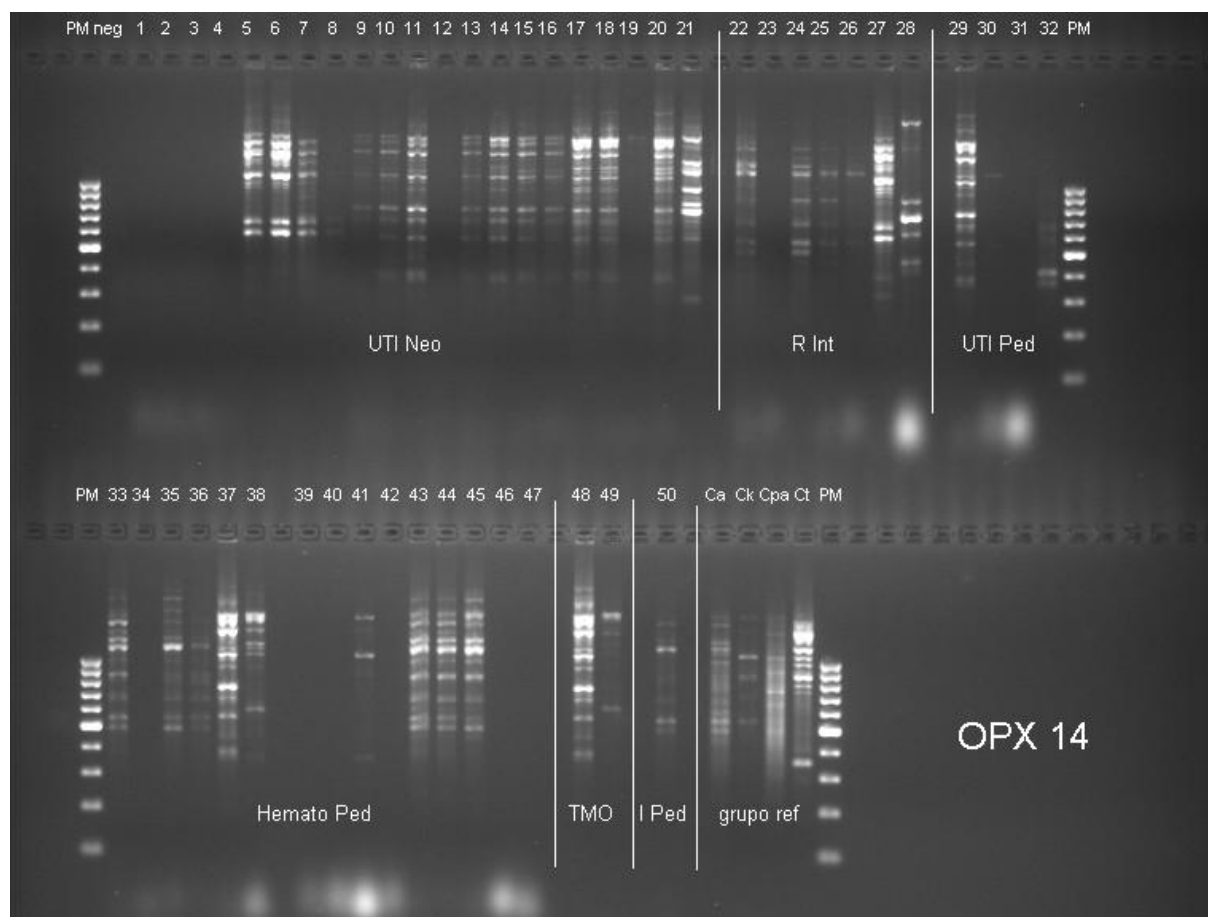
4.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Setenta e um marcadores RAPD foram obtidos com o uso de 4 iniciadores. O perfil de amplificação para cada iniciador utilizado pode ser visualizado nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.



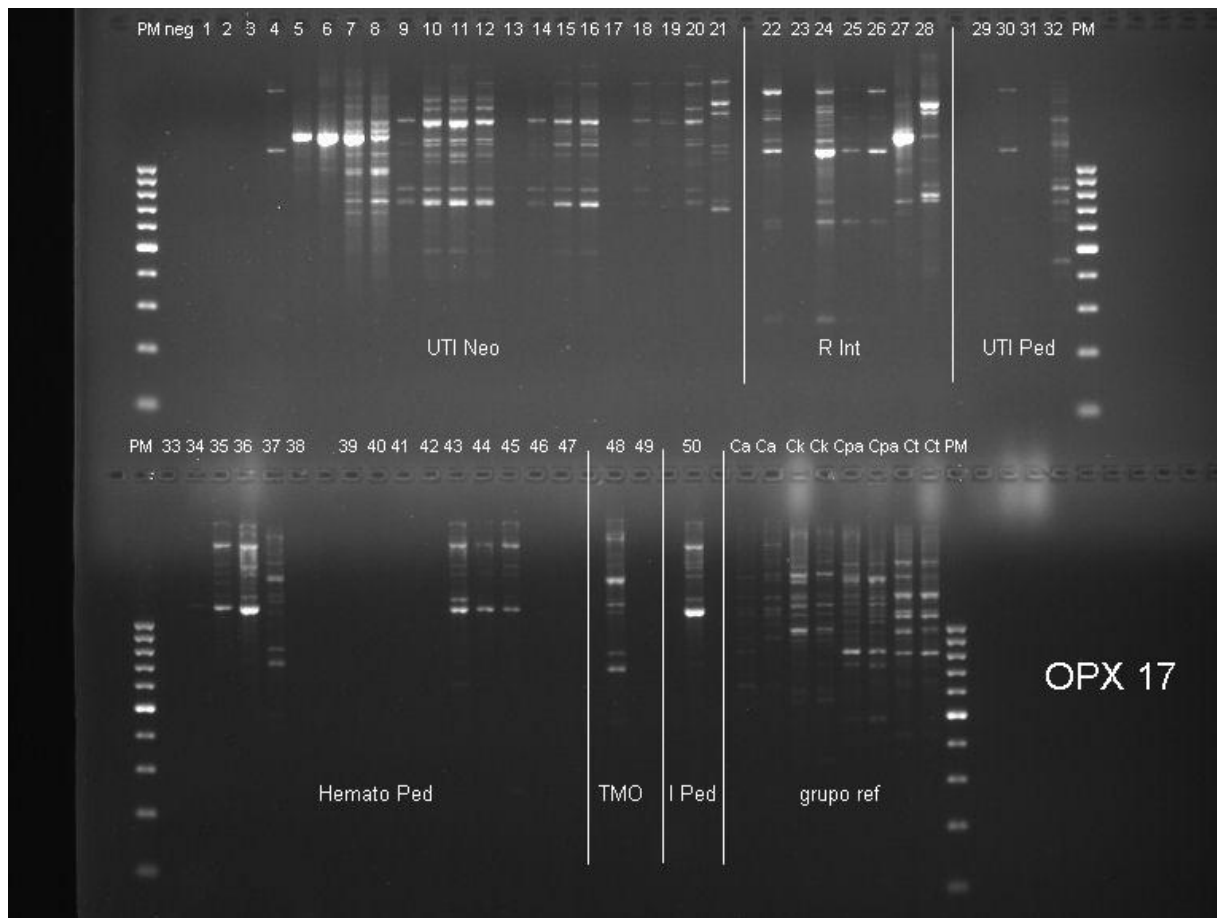
Legenda – PM: marcador de peso molecular (100 pb); neg: controle negativo; UTI Neo: UTI Neonatal; R Interm: Risco Intermediário; UTI Ped: UTI Pediátrica; Hemato Ped: Hematologia Pediátrica; TMO: Transplante de Medula Óssea; I Ped: Infectologia Pediátrica; grupo ref: linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*).
 FONTE: O autor (2008)

FIGURA 1 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Candida* spp. COM O INICIADOR OPX12



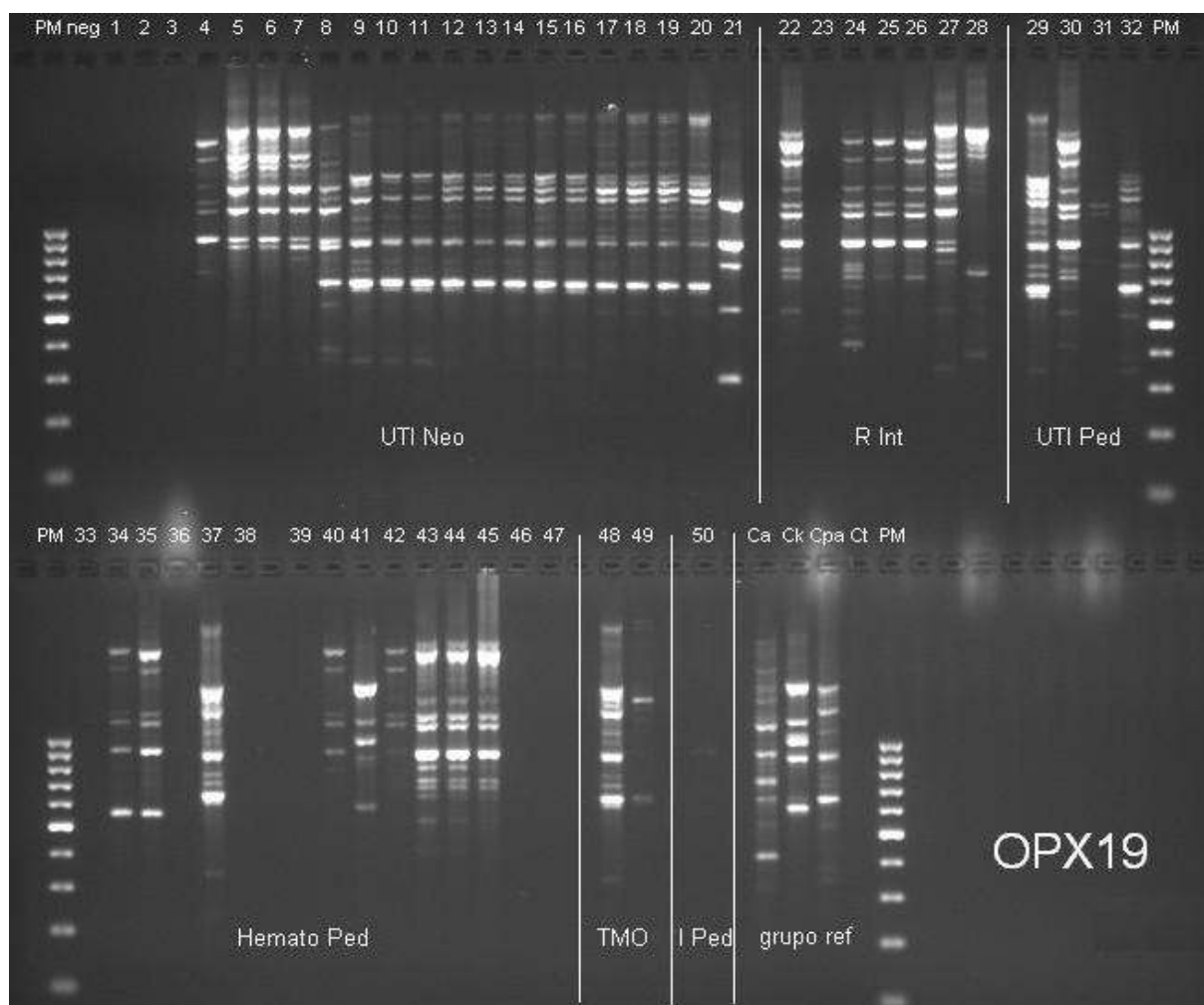
Legenda – PM: marcador de peso molecular (100 pb); neg: controle negativo; UTI Neo: UTI Neonatal; R Interm: Risco Intermediário; UTI Ped: UTI Pediátrica; Hemato Ped: Hematologia Pediátrica; TMO: Transplante de Medula Óssea; I Ped: Infectologia Pediátrica; grupo ref: linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*).
 FONTE: O autor (2008)

FIGURA 2 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Candida* spp. COM O INICIADOR OPX14



Legenda – PM: marcador de peso molecular (100 pb); neg: controle negativo; UTI Neo: UTI Neonatal; R Interm: Risco Intermediário; UTI Ped: UTI Pediátrica; Hemato Ped: Hematologia Pediátrica; TMO: Transplante de Medula Óssea; I Ped: Infectologia Pediátrica; grupo ref: linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*).
 FONTE: O autor (2008)

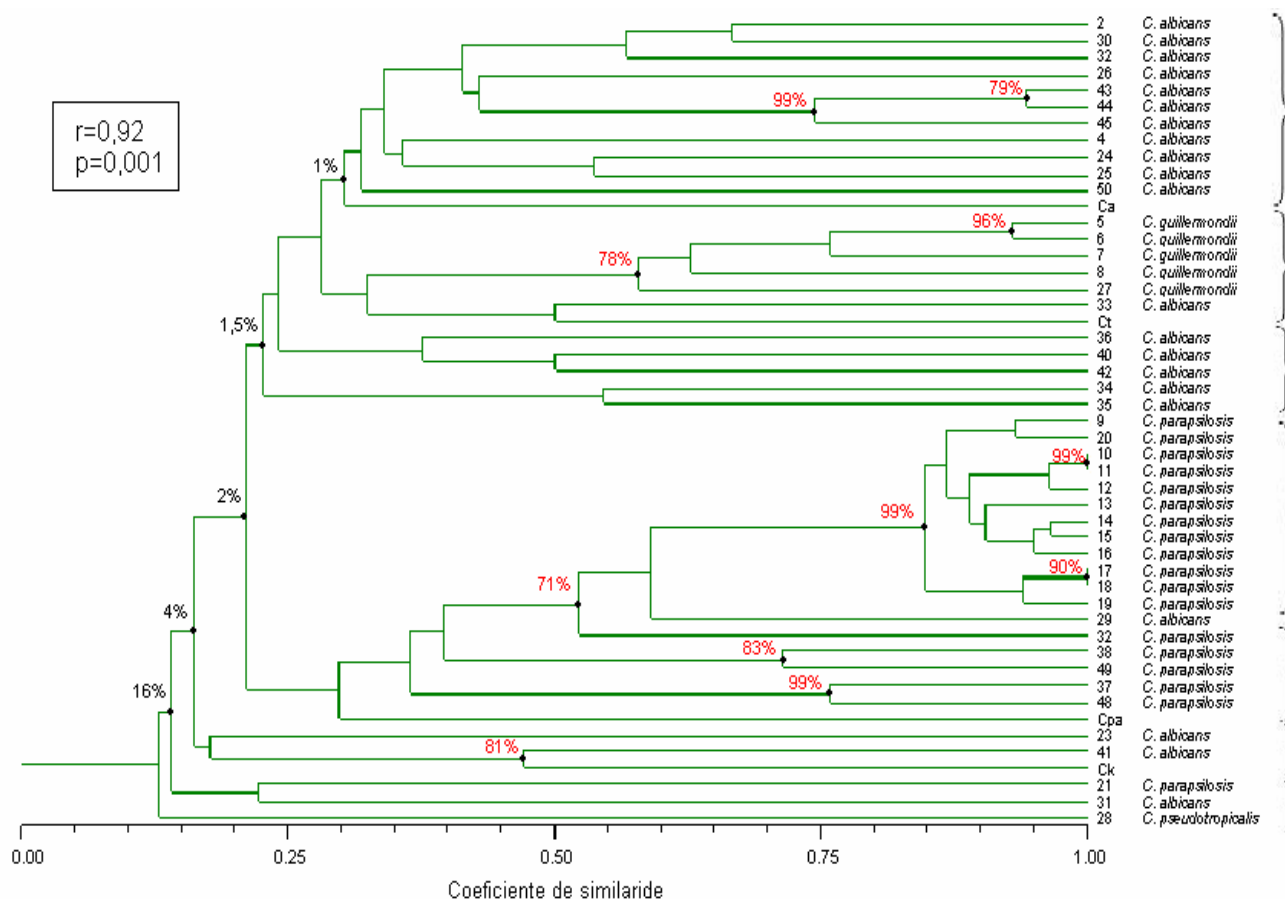
FIGURA 3 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Candida* spp. COM O INICIADOR OPX17



Legenda – PM: marcador de peso molecular (100 pb); neg: controle negativo; UTI Neo: UTI Neonatal; R Interm: Risco Intermediário; UTI Ped: UTI Pediátrica; Hemato Ped: Hematologia Pediátrica; TMO: Transplante de Medula Óssea; I Ped: Infectologia Pediátrica; grupo ref: linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*).
 FONTE: O autor (2008)

FIGURA 4 – PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Candida* spp. COM O INICIADOR OPX19

De acordo com os perfis de amplificação obtidos, verificou-se a presença de polimorfismo entre os isolados de um mesmo local, e também entre isolados provenientes de locais diferentes (figuras 1, 2, 3 e 4). A análise dos dados, utilizando o programa NTSYSpc 2.1, o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, gerou um dendrograma que mostrou a separação dos isolados em sete grupos com maior consistência, considerando os valores de *bootstrap* superiores a 80% (FIGURA 5).

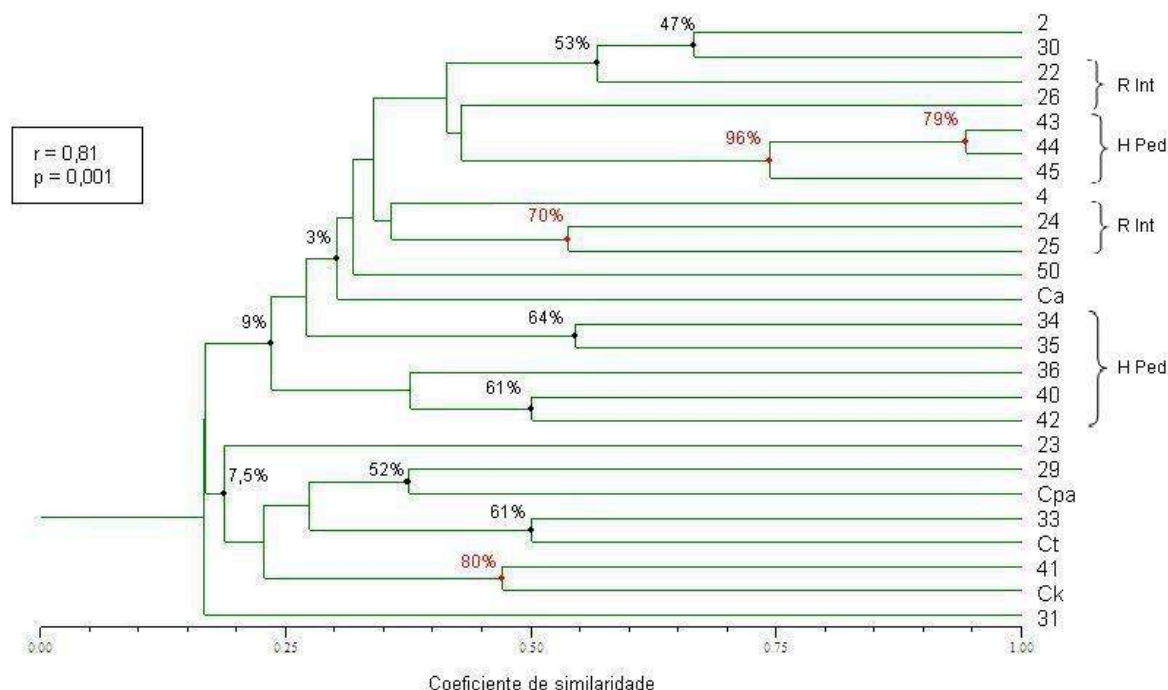


Legenda: isolados de *Candida* spp. (nº 2 a 50), e linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*).

FIGURA 5 - DENDROGRAMA DE TODOS OS ISOLADOS de *Candida* spp., GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD, UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA

O dendrograma mostrou a formação de agrupamentos diferentes para os isolados de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans*, onde os isolados de *C. albicans* apresentaram-se distribuídos ao longo do dendrograma em pelo menos três subgrupos diferentes.

Com a finalidade de melhor observar os agrupamentos, foram feitas análises separadas dos isolados de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans*. Utilizando o programa NTSYSpc 2.1, o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, foram gerados dois dendrogramas independentes (FIGURAS 6 e 7).



Legenda: isolados de *C. albicans*, e linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*); H Ped: Hematologia Pediátrica; R Int: Risco Intermediário

FIGURA 6 - DENDROGRAMA DOS ISOLADOS DE *C. albicans*, GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA

O dendrograma independente para isolados de *C. albicans* (FIGURA 6) confirmou os agrupamentos observados para esta espécie no dendrograma geral (FIGURA 5). Entretanto, foi possível observar que os isolados de *C. albicans*, previamente identificados por morfologia e fisiologia, apresentaram polimorfismo, formando alguns agrupamentos relacionados com a unidade de origem das amostras.

O primeiro agrupamento consistente reuniu três isolados de *C. albicans* (nº 43, 44 e 45), provenientes de um mesmo paciente da unidade de Hematologia Pediátrica, coletados a partir do sangue periférico em datas diferentes, em um intervalo de três meses. A similaridade genética entre os isolados deste paciente foi de aproximadamente 75%, com elevado valor de *bootstrap* (96%), indicando que os patógenos causadores da candidemia eram muito semelhantes. O paciente era portador de síndrome de Down, cardiopatia e estava em tratamento quimioterápico para leucemia linfóide aguda, além de ter recebido nutrição parenteral total, antibioticoterapia de amplo espectro e anfotericina B. Estes fatores de risco, associados à análise do

dendrograma, sugeriram que os episódios de candidemia foram causados por patógenos distintos, porém geneticamente relacionados, provavelmente de fonte endógena, devido aos procedimentos invasivos aos quais o paciente foi submetido.

Observou-se um segundo agrupamento, que reuniu dois isolados (nº 24 e 25), provenientes de um mesmo paciente da unidade Risco Intermediário, e coletados a partir do sangue periférico na mesma data. O coeficiente de similaridade entre estes isolados foi de aproximadamente 55% (*bootstrap* 70%). O paciente era um recém-nato, admitido na unidade com atresia de duodeno e hipoglicemia, e que recebeu antibióticos de amplo espectro. A análise dos dados sugeriu uma possível coinfeção por patógenos geneticamente relacionados.

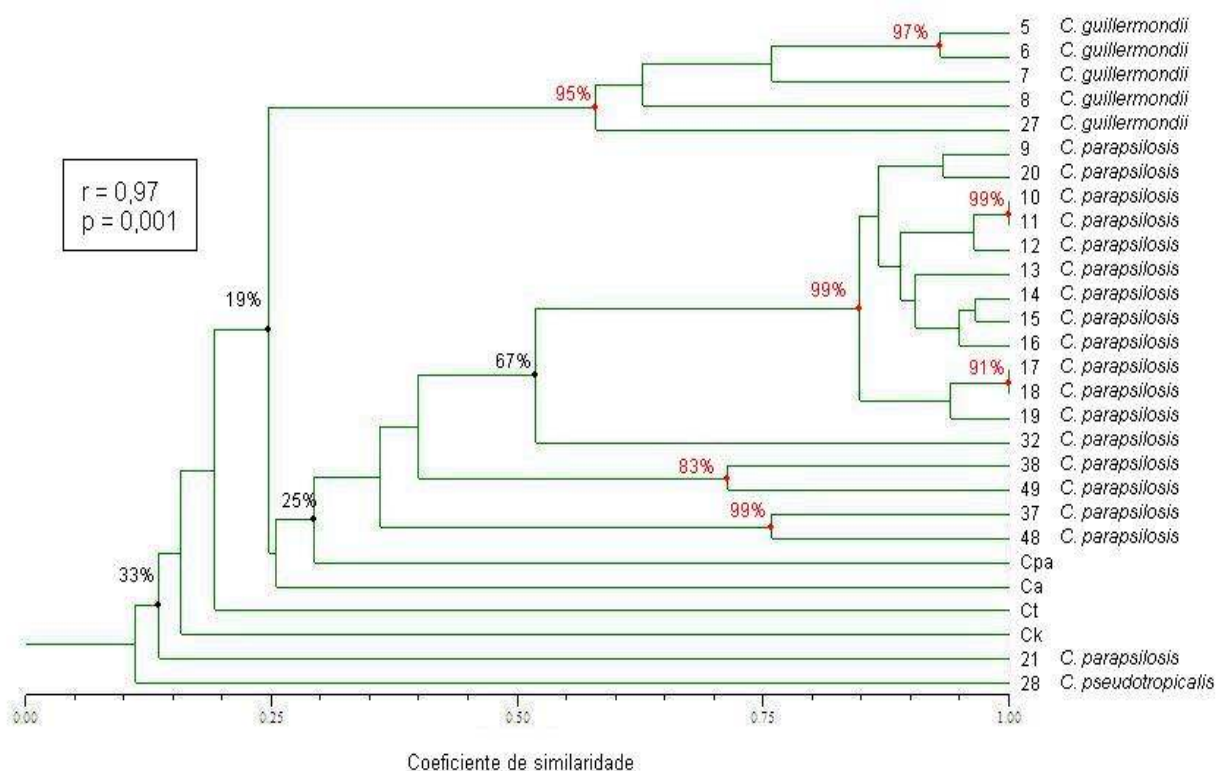
Outro agrupamento interessante reuniu alguns isolados da Hematologia Pediátrica, cujos pacientes sofriam de doenças hematológicas e estavam em tratamento quimioterápico. Os isolados 34, 35 e 36 foram obtidos de um mesmo paciente, e todos foram coletados na mesma data. Observou-se uma grande distância genética (cerca de 40%) entre o isolado 36 e os demais, e também entre os isolados 34 e 35 (cerca de 55%). Estas informações podem indicar que a candidemia neste paciente foi determinada pela coinfeção de patógenos geneticamente relacionados. Por outro lado, os isolados 40 e 42 foram obtidos de pacientes distintos, e com apenas um mês de diferença. Verificou-se um coeficiente de similaridade de 50%, indicando relação genética entre os agentes causadores das candidemias. O sequenciamento da região ITS pode confirmar estas inferências.

Ocorreram três agrupamentos entre isolados identificados como *C. albicans* e as linhagens referência. O isolado 29 agrupou com a linhagem de *C. parapsilosis*, o isolado 33 agrupou com a linhagem de *C. tropicalis*, e o isolado 41 agrupou com a linhagem de *C. krusei*. A baixa similaridade genética destes grupos (< 50%) e os valores de *bootstrap* de até 80%, tornam necessário o estudo das sequências ITS para confirmação destas identificações.

O isolado 31, proveniente de um paciente da UTI Pediátrica, também foi previamente identificado como *C. albicans*. Entretanto, sua relação genética com o restante das amostras mostrou-se muito distante, evidenciando a necessidade de futuros estudos genéticos para esclarecer sua identificação. De acordo com Eloy *et al.* (2006), a maioria das infecções fúngicas que surgem em UTIs é causada por amostras não relacionadas, reforçando a idéia de que os pacientes ancoram seus próprios isolados de *C. albicans*.

A análise das informações apresentadas na Figura 6 não permitiu avaliar a presença de contaminação cruzada, uma vez que os pacientes não estavam na mesma unidade de internação durante o mesmo período.

Para os isolados de *Candida* não-*albicans*, foi observada a ocorrência de três espécies: *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis* e *C. parapsilosis*, sendo esta última a mais prevalente. De acordo com o polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, observou-se pelo menos quatro agrupamentos de grande consistência, com valores de *bootstrap* maiores que 90% (FIGURA 7).



Legenda: isolados de *C. não-albicans*, e linhagens referência (Ca = *C. albicans*, Ck = *C. krusei*, Cpa = *C. parapsilosis*, Ct = *C. tropicalis*).

FIGURA 7 - DENDROGRAMA DOS ISOLADOS DE *Candida* não-*albicans*, GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD, UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA.

O primeiro agrupamento reuniu dois isolados de *C. guilliermondii* (nº 5 e 6), com similaridade acima de 90% e valor de *bootstrap* de 97%. Os isolados foram obtidos de dois pacientes distintos, com três dias de diferença, ambos na UTI Neonatal. Os pacientes eram bebês prematuros, que não apresentavam quadro de candidemia no momento da admissão à UTI Neonatal. Sabe-se que *C. guilliermondii* faz parte da microbiota normal da pele e das superfícies mucosas do ser humano, causa

infecções clinicamente similares àsquelas causadas por *C. parapsilosis*, e a invasão de ambas as espécies está relacionada à presença de cateter venoso central (GIRMENIA *et al.*, 2006). A análise destas informações permitiu supor que a candidemia ocorreu por infecção cruzada de fonte exógena em ambos os casos, e que os patógenos apresentam grande semelhança genética.

O segundo agrupamento reuniu 12 isolados de *C. parapsilosis* com similaridade de 85% e valor de *bootstrap* 99%. Dois subgrupos foram encontrados com similaridade genética de 100%: entre os isolados 10 e 11 (*bootstrap* de 99%) coletados do mesmo paciente com dez dias de diferença, e entre os isolados 17 e 18 (*bootstrap* de 90%) coletados do mesmo paciente com intervalo de três dias. Estes 12 isolados foram obtidos de sete pacientes internados na UTI Neonatal, e foram coletados no período de fevereiro de 1999 a dezembro de 2006, a partir do sangue periférico. A análise dos prontuários destes sete pacientes revelou que seis apresentavam fatores de risco para candidemia: prematuridade, nutrição parenteral total e uso de antibióticos de amplo espectro. Não houve registro de candidemia anterior à internação na UTI Neonatal, e não houve relação entre os períodos de internação dos sete pacientes.

Outros isolados foram reunidos em pequenos agrupamentos com baixa similaridade, porém com relativa consistência. Os isolados 38 e 49 de *C. parapsilosis*, procedentes de um paciente internado na Hematologia Pediátrica e outro no Transplante de Medula Óssea, coletados com aproximadamente um mês de diferença, apresentaram mais de 70% de similaridade genética (*bootstrap* 83%). Situação semelhante aconteceu com os isolados 37 e 48 de *C. parapsilosis*, também procedentes de um paciente internado na Hematologia Pediátrica e outro no Transplante de Medula Óssea, e coletados com um mês de diferença. Neste caso o coeficiente de similaridade ficou acima de 75%, com valor de *bootstrap* de 99%.

O papel de *C. parapsilosis* como patógeno exógeno tem sido associado com alimentação parenteral, com a presença de dispositivos intravasculares e com a contaminação cruzada, devido ao carregamento através das mãos dos profissionais de saúde (BASSETTI *et al.*, 2006; MEDRANO, *et al.*, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007). De acordo com Shin *et al.* (2005), a maioria dos casos de infecção nosocomial que ocorre em recém-nascidos tem origem nas unidades hospitalares.

Analizando as informações obtidas, foi possível concluir que a *C. parapsilosis* causadora de candidemia na UTI Neonatal era proveniente de fonte exógena, uma vez que não houve relato de candidemia presente no momento de internação nesta

unidade, e não houve relação entre os períodos de internamento dos diferentes pacientes. Entretanto, os mecanismos pelos quais a candidemia foi adquirida permanecem desconhecidos. Uma vez que os agrupamentos de *Candida* spp. foram identificados e analisados de forma retrospectiva, não foi possível encontrar evidências de que algum membro da equipe tenha servido como contaminador comum, ou de que tenha ocorrido contaminação no ambiente hospitalar.

O uso de marcadores RAPD foi capaz de identificar e diferenciar espécies de *Candida* isoladas de pacientes pediátricos com candidemia. O estudo dos perfis de amplificação destes isolados forneceu informações importantes sobre a epidemiologia da candidemia nestes pacientes, bem como sobre a variabilidade genética dos patógenos causadores da doença. Simples e relativamente rápido, o RAPD pode ser considerado uma ferramenta adequada para estudos epidemiológicos e taxonômicos das leveduras do gênero *Candida*.

5 PERSPECTIVAS

O uso combinado de técnicas morfológicas e moleculares para analisar espécies de *Candida*, obtidas de pacientes com candidemia, permanece atual (BART-DELABESSE *et al.*, 1995; SAN MIGUEL *et al.*, 2004; RESENDE *et al.*, 2004).

Com a finalidade de diminuir a ocorrência de candidemia nosocomial, há autores que indicam a necessidade de amplos estudos abordando aspectos relacionados à prevenção e profilaxia (COLOMBO *et al.*, 2006). Neste sentido, a implementação de protocolos de lavagem das mãos, cuidados adequados com cateter venoso central e o uso prudente de antibióticos precisam ser avaliados (VRIONI; MATSIOTA-BERNARD, 2001; SMITH; STEINBACH; BENJAMIN Jr., 2005; SHIN *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Estudos epidemiológicos recentes têm utilizado técnicas moleculares, como sequenciamento de DNA, *real-time PCR* e *microarray*. Estas técnicas apresentam como vantagens a diminuição das etapas de manipulação de amostras pós-amplificação e conseqüente redução dos riscos de contaminação, além da redução do tempo total de identificação das espécies de *Candida*.

Estudos de expressão gênica e testes de suscetibilidade *in vitro*, com isolados obtidos de pacientes, representam importante contribuição para direcionar a terapêutica antifúngica, uma vez que podem elucidar questões relacionadas à sensibilidade e resistência dos patógenos (ROCHA *et a.*, 2008).

CONCLUSÕES

A realização do estudo com isolados de *Candida* spp. obtidos de hemoculturas de pacientes pediátricos do HC-UFPR com candidemia, permitiu concluir que:

- a) A prevalência de *Candida* não-*albicans*, particularmente *C. parapsilosis*, em amostras provenientes da UTI Neonatal, está em conformidade com observações semelhantes realizadas por outros autores em hospitais terciários brasileiros.
- b) Os agrupamentos observados entre alguns isolados de *C. parapsilosis* evidenciaram a UTI Neonatal como local de maior incidência desta espécie nos pacientes pediátricos do HC-UFPR, sugerindo possível fonte exógena de infecção.
- c) A análise da variabilidade genética dos isolados demonstrou a ocorrência de coinfeção em alguns pacientes.
- d) O uso de marcadores moleculares RAPD foi importante para a avaliação de aspectos epidemiológicos e taxonômicos da candidemia, e evidenciou polimorfismos intra e interespecíficos no gênero *Candida*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, J.; BODEY, G. P.; HANNA, H. A.; MARDANI, M.; GIRGAWY, E.; ABI-SAID, D.; WHIMBEY, E.; HACHEM, R.; RAAD, I. *Candida krusei* fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients. **Arch. Intern. Med.**, v.160, p. 2659-2664, 2000.
- ABI-SAID, D; ANAISSE, E; UZUN, O.;RAAD, I. PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.**; v. 24, p. 1122-1128, 1997.
- AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A. S.; KHAN, Z. U. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2483-2489, 2002.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B. J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S. K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; WARNOCK, D. W.; PAHISSA, A.; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 1829-1835, 2005.
- BARBERINO, M. G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A. P.; NETTO, E. M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Braz. J. of Infect. Dis.**, v. 10, n. 1, p. 36-40, 2006.
- BARBIERI, D. S. V; VICENTE, V. A.; FRAIZ, F. C. **Análise da aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica – Área de concentração: Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em <<http://hdl.handle.net/1884/2285>>. Acesso: julho/2008.
- BART-DELABESSE, E.; DEVENTER, H. van; GOESSENS, W.; POIROT, J. L.; LIORET, N.; BELKUM, A. Van ; DROMER, F. Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3278-3283, 1995.
- BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, n. 21, p. 2334-2339, 2006.

BAUTISTA-MUÑOZ, C.; BOLDO, X. M.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. **J. Clin. Microbiol.**, v 41, n. 1, p. 414-420, 2003.

BENJAMIM, D. K. Jr. ; DeLONG, E. R. ; STEINBACH, W. J. ; COTTON, C. M. ; WALSH, T. J. ; CLARK, R. H. Empirical therapy for neonatal candidemia in very low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 112, n. 3, p. 543-547, 2003.

BENNETT, J. E. Candidiasis. In: KASPER, D.L. *et al.* (Eds.). **Harrison's principles of internal medicine**. McGraw-Hill, 2005. p. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/spb/ovidweb.cgi?&S=PKBKFP COMDDDL PBBNCHLHHPL FEPPAA00&FTS+Content=S.sh.2.14.15%7c2%7c%2fbookdb%2f00139931%2f16th_Edition%2f5%2fPG%280%29%ReturnToBrowseBooks=Browse+Content%3dS.sh.2.14%7c0%7c2>. Acesso em: nov/2007.

BOTTEREL, F.; DESTERKE, C.; COSTA, C.; BRETAGNE, S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 11, p. 4076-4081, 2001.

BOUGNOUX, M. E.; MORAND, S.; d'ENFERT, C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 1290-1297, 2002.

BUKHARIE, H. A. Nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. **Mycopathologia**, v. 153, p. 195-198, 2001.

CHENG, M. F.; YANG, Y. L.; YAO, T. J.; LIN, C. Y.; LIU, J. S.; TANG, R. B.; YU, K. W.; FAN, Y. H.; HSIEH, K. S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, n. 22, 2005.

CLARK, T. A.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; BRANDT, M. E.; WEBB, R. M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRIDKIN, S. K.; HAJJEH, R. A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a community hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.

CLEMONS, K.V.; FERROZE, F.; HOLMBERG, K.; STEVENS, D.A. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 1332-1336, 1997.

COELHO, A. S. G. **Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias e similaridades genéticas através de procedimentos de bootstraps BOOD 3.03**. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFGO, 2005.

COIGNARD, C.; HURST, S. F.; BENJAMIN, L. E.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 858-861, 2004.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. B. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 281-286, 1999.

COLOMBO, A.L.; MELO, A.S.; CRESPO ROSAS, R.F.; SALOMÃO, R.; BRIONES, M.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 46, p. 253-257, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; da MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

DE HOOG, G.S.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potencial of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v. 42, p. 405-416, 2004.

DIEZMANN, S.; COX, C. J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T. G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 12, p. 5624-5635, 2004.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n.6, p. 591-594, 2005.

DURÁN, E.; de OCÁRIZ, I. R.; VENTURA, P.; GIL, J.; RUBIO, C. Candidemia: *Candida parapsilosis* en una unidad de neonatología. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, 2005.

ELOY, O.; MARQUE, S.; BOTTEREL, F.; STEPHAN, F.; COSTA, J. M.; LASSERRE, V.; BRETAGNE, S. Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, n. 162, p. 2334-2441, 2006.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *International Journal of Organic Evolution*. Lancaster, v. 39, p. 366-369, 1985.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

- FRIDKIN, S.K.; KAUFMAN, D.; EDWARDS, J.R.; SHETTY, S.; HORAN, T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. **Pediatrics**, v. 117, n. 5, p. 1680-1687, 2006.
- FU, Y.; LUO, G.; SPELLBERG, B. J.; EDWARDS Jr, J. E.; IBRAHIM, A. S. Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 3, p. 483-492, 2008.
- GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 7, p. 2458-2464, 2006.
- GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; da MATTA, D. A.; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 401-405, 2003.
- GÜNDEŞ, S.G.; GULENC, S.; BINGOL, R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, n. 12, p. 1105-1110, 2001.
- JONES, T.; FEDERSPIEL, N. A.; CHIBANA, H.; DUNGAN, J.; KALMAN, S.; MAGEE, B. B.; NEWPORT, G.; THORSTENSON, Y. R.; AGABIAN, N.; MAGEE, P. T.; DAVIS, R. W.; SCHERER, S. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 19, p. 7329-7334, 2004.
- LEHMANN, P. F.; LIN, D.; LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, 1992.
- MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 187-193, 2005.
- MARIANO, P. L. S.; MILAN, E. P.; MATTA, D. A. da; COLOMBO, A. L. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 533-538, 2003.
- McCLELLAND, M.; WELSH, J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. **PCR Methods Appl.**, v. 4, p. 59-65, 1994.
- MEDRANO, D. J.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. de A.; ROCHA, M. F.; RABENHORST, S. H.; SIDRIM, J. J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.
- MOREIRA, M. E. L. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. **J. Pediatr.**, v. 81, (1 Supl), p. S52-S58, 2005.
- ODDS, F. C. *Candida* infections: an overview. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1987.

ODDS, FC; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994.

OTERO, L.; VÁZQUEZ, F.; PALACIO, V.; VÁZQUEZ, S.; CARREÑO, F.; MÉNDEZ, F. J. Comparison of seven phenotyping methods for *Candida albicans*. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 11, n. 2, p. 221-224, 1995.

PASQUALOTTO, A. C.; NEDEL, W. L.; MACHADO, T. S.; SEVERO, L. C. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatrics and adults with nosocomial candidaemia. **Mycopathologia**, v. 160, p. 111-116, 2005.

PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p.58-61, 1996.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PINTO, P. M.; RESENDE, M. A.; KOGA-ITO, C. Y.; TENDLER, M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. Isolates using random amplified polymorphic DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, 2004.

RESENDE J., C. P.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A.; HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. Isolated from hospitalizes patients. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 21, p. 24-28, 2004.

ROBERT, F.; LEBRETON, F.; BOUGNOUX, M. E.; PAUGAM, A.; WASSERMANN, D.; SCHLOTTERER, M.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. **J Clin Microbiol.**, v. 33, n. 9, p. 2366-2371, 1995.

ROCHA, B. A.; Del NEGRO, G. M. B.; YAMAMOTO, L.; SOUZA, M. V. B. de; PRECIOSO, A. R.; OKAY, T. S. Identification of *Candida* species from pediatric patients by random amplified polymorphic DNA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 1, p. 1-5, 2008.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; FILIOTI, J.; TSIVITANIDOU, M.; SOFIANOU, D.; KREMENOPOULOS, G.; WALSH, T. J. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 735-741, 2003.

ROHLF, F.L.J. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **Exeter Publishing**, New York, 1988.

SAN MIGUEL, L. G.; PLA, J.; COBO, J.; NAVARRO, F.; SÁNCHEZ-SOUSA, A.; ALVAREZ, M. E.; MARTOS, I.; MORENO, S. Morphotypic and genotypic characterization of sequential *Candida parapsilosis* isolates from an outbreak in a pediatric intensive care unit. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 49, p. 189-196, 2004.

SCHERER, S.; MAGEE, P. T. Genetics of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, v. 54, n. 3, p. 226-241, 1990.

SENDID, B.; CAILLOT, D.; BACCOUCH-HUMBERT, B.; KLINGSPOR, L.; GRANDJEAN, M.; BONNIN, A.; POULAIN, D. Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 10, p. 4551-4558, 2003.

SHIN, J. H.; OG, Y. G.; CHO, D.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a University Hospital over a five-year period. **J. Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 546-554, 2005.

SILVA, V.; CABRERA, M.; DÍAZ, M. C.; ABARCA, C.; HERMOSILLA, G. Prevalencia de serotipos de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 20, n. 2, p. 46-51, 2003.

SMITH, P. B.; STEINBACH, W. J.; BENJAMIN Jr., D. K. Invasive *Candida* infections in the neonate. **Drug Resist. Updat.**, v. 8, p. 147-162, 2005.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. San Francisco, *Numerical taxonomy*. Freeman, 1973. 573 p.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TINGEY, S. V.; del TUFO, J. P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 349-352, 1993.

- TORTORANO, A. M.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C. C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, n. 4, p. 317-322, 2004.
- VALÉRIO, H. M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; RESENDE, M. A. de. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 2, p. 174-178, 2006.
- VRIONI, G; MATSIOTA-BERNARD, P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. **J. Infect.**, v. 42, n. 1, p. 50-56, 2001.
- WELSH, J; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, p. 1232-1239, 2005.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

INMETRO. Sistema Internacional de Unidades – SI. 8. ed. (revisada), Rio de Janeiro, 2007. 114p. (Tradução da 7ª. Edição do original francês *Lé Système International d'Unités*, elaborado pelo Bureau International des Poids et Mesures – BIPM). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/Resumo_SI.pdf>. Acesso em: 25/09/2008.

MOREIRA, M. Variabilidade **genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração Microbiologia) – Departamento de Patologia Básica e Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/1884/4987/1/Tese_-_M%c3%b4nica%20pdf%20%202006.pdf>. Acesso em: 20/11/2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 2).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Citações e notas de rodapé**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 3).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e editoração**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 9).

APÊNDICE

1 PREPARO DE MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Meio de cultura Ágar Saboraud Dextrose (SDA)

Peptona	10,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Os reagentes foram misturados e aquecidos em micro-ondas, até completa dissolução. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C, o pH foi ajustado para 5,6. O ágar foi distribuído em placas de Petri e tubos, de acordo com a necessidade.

Meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA)

<i>Potato Dextrose Agar</i> (HIMEDIA)	35,0 g
Água destilada	1000 ml

Os reagentes foram misturados e aquecidos em micro-ondas, até completa dissolução. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C, o pH foi ajustado para 5,6. O ágar foi distribuído em placas de Petri e tubos, de acordo com a necessidade.

Solução Salina

NaCl	8,5 g
Água destilada	1000 ml

O NaCl foi dissolvido parte da água destilada, e em seguida o volume foi ajustado para 1000 ml.

Solução EDTA – 0,5M

EDTA	186,12 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

O EDTA foi dissolvido em 700 ml de água. Em seguida, o volume foi ajustado para 1000 ml.

Solução NaOH – 5M

NaOH	20,0 g
H ₂ O q.s.p.	100 ml

O NaOH foi misturado em 50 ml de água até completa dissolução. Em seguida, o volume foi ajustado para 100 ml.

Tampão CTAB

Tris base	2,42 g
NaCl	8,2 g
Na-EDTA	0,74 g
CTAB	2,0 g
H ₂ O ultrapura autoclavada	80 ml

Os reagentes foram misturados em metade do volume da água e a solução foi aquecida para completar a dissolução. Em seguida, o volume foi ajustado para 100 ml com o restante da água ultrapura autoclavada.

Tampão TBE 10X (solução estoque)

Tris base	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA 0,5 M ph 8,0	40,0 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

O Tris base e o ácido bórico foram dissolvidos em 700 ml de H₂O. Foi adicionado o EDTA. Em seguida, o volume foi ajustado para 1000 ml. A solução estoque foi autoclavada a 121 °C, durante 15 minutos, e armazenada, após resfriamento, à temperatura ambiente.

Tampão TBE 1X (solução de trabalho)

TBE 10X	100 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

O TBE 10X foi diluído na água, e o volume foi ajustado para 1000 ml. Esta solução de trabalho foi armazenada à temperatura ambiente.

Loading Buffer 5X

Tris base	0,60 g
EDTA	1,68 g
SDS	0,50 g
Azul de bromofenol	0,10 g
Sacarose	40,0 g
H ₂ O q.s.p.	100 ml

O Tris base e o EDTA foram dissolvidos em 50 ml da água. Usando HCl, o pH foi ajustado para 7,6. Foram acrescentados o SDS, o azul de bromofenol e a sacarose. Em seguida, o volume foi ajustado para 100 ml, com o restante da água. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, em frasco âmbar.

Gel de Agarose 1,4%

TBE 1X	400 ml
Agarose	5,6 g

Em um *erlenmeyer* de uso exclusivo para preparo de gel foram colocados o TBE 1X e a agarose. A mistura foi aquecida em microondas durante 5 minutos, tendo sido agitada duas ou três vezes durante o aquecimento. Após cerca de 20 minutos de resfriamento, foram acrescentados 20 µl de brometo de etídio. O gel foi homogeneizado e vertido sobre a bandeja contendo os pentes para formar os poços. Depois da polimerização, o gel foi colocado no interior da cuba de eletroforese, contendo TBE 1X, e foram retirados os pentes.